

Campos electromagnéticos e hipertermia dañan irreparablemente las células cancerosas.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Resumen | 4 |
| 1. Introducción..... | 6 |
| 1.1. Fisiopatología del cáncer Desarrollo de metástasis. | 11 |
| 1.2. Factores implicados en la adquisición de quimioresistencia y/o radioresistencia. | 16 |
| 1.2.1. Características intrínsecas de las células tumorales | 17 |
| 1.2.2. Microambiente tumoral..... | 18 |
| 1.2.3. Alteraciones en los mecanismos de muerte celular | 18 |
| 1.3. Cánceres con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas. | 21 |
| 1.4. Pterostilbeno en la terapia del cáncer | 25 |
| 1.5. Radiaciones electromagnéticas y tumor treating fields (TTFields). | 28 |
| 1.6. La hipertermia en oncoterapia. | 30 |
| 1.7. La asociación de TTFields con técnicas no invasivas de inducción de hipertermia localizada. | 33 |
| 2. Objetivos..... | 38 |
| 3. Materiales y Métodos..... | 39 |
| 3.1 Cultivo de células..... | 39 |
| 3.2 Configuración experimental para el tratamiento combinado con EMF y HT in vitro | 39 |
| 3.3 La ecuación matemática permite calcular la inducción magnética B-campo (Tesla) a lo largo del eje de la bobina a 3mm de su superficie (aprox. 25 μ T)..... | 41 |
| 3.4 Análisis de flujo citométrico y muerte celular | 41 |
| 3.5 Citocromo c, factor inductor de apoptosis y proteínas de choque térmico. | 42 |
| 3.6 Potencial de la membrana mitocondrial | 43 |
| 3.7 Consumo de oxígeno | 43 |
| 3.8 Generación de H ₂ O ₂ y O ₂ -..... | 44 |
| 3.9 Compartimentación de células cancerosas | 44 |
| 3.10 ATP | 44 |
| 3. 11Glutati6n | 44 |
| 3.12 Caspasa 3..... | 44 |
| 3.13 Integridad de la membrana lisos6mica | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 3.14 Actividades de las cathepsinas | 45 |
| 3.15 Silenciamiento génico | 46 |
| 3.16 Xenografts de tumores..... | 46 |
| 3.16 Configuración experimental para el tratamiento in vivo..... | 47 |
| 3.18 Declaración ética | 49 |
| 4. Análisis estadístico..... | 50 |
| 5. Resultados: Modelos de GBM, melanoma y cáncer de páncreas humano | 50 |
| 5.1 EMFs y HT aumentan la generación de ROS y la liberación de señales de muerte de las mitocondrias | 53 |
| 5.2 EMFs y HT aumentan la permeabilidad lisosómica..... | 53 |
| 5.3 Estrategias para complementar el efecto anti-cáncer de los EMF y HT y facilitar la eliminación completa de las células cancerosas | 55 |
| 5.4 La combinación de EMFs, HT y quimioterapia estándar induce la regresión de injertos de cáncer de páncreas humanos. | 58 |
| 6. Discusión..... | 60 |
| 7. Conclusión | 65 |
| 7.1 Financiamiento..... | 66 |
| 7.2 Disponibilidad de materiales de datos..... | 66 |
| 7.3 Cumplimiento de los requisitos éticos | 66 |
| 7.4 Declaración de intereses en conflicto. | 66 |
| 7.5 Apéndice A. Datos suplementarios..... | 66 |
| 8. Referencias bibliográficas | 67 |
| 8. Anexos | 89 |
| 8.1 Explicación de figuras..... | 98 |
| 8.2 Resumen gráfico | 103 |
| 8.3 Aspectos destacados de la investigación..... | 104 |
| 8.4 Materiales suplementarios..... | 114 |

Resumen

Introducción: Se está desarrollando el uso de radiaciones no ionizantes (NIR), como los campos de tratamiento de tumores, los ultrasonidos de alta intensidad enfocados (HIFU) o las microondas de alta frecuencia, para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, en la actualidad, sus aplicaciones y eficacia son limitadas. En términos de combinaciones potenciales, se ha investigado ampliamente el uso de nanopartículas magnéticas biocompatibles como mediadores de calor. Sin embargo, el desarrollo de medios de nano medicación más eficientes que puedan exhibir tasas de absorción específicas elevadas sigue siendo un problema sin resolver.

Objetivo: Investigar si los campos magnéticos aplicados externamente y una NIR inductora de calor afectan la viabilidad celular del tumor.

Métodos: Bajo condiciones in vitro, se trataron diferentes células cancerosas humanas (melanoma A2058, carcinoma de páncreas AsPC1, carcinoma de mama MDA-MB-231) con la combinación de campos electromagnéticos (EMFs, usando solenoides) e hipertermia (HT, usando un baño termostataado). También se estudió el efecto de la NIR en combinación con la quimioterapia estándar y la terapia dirigida. Se probó un dispositivo experimental que combina EMFs y HT inducida por HIFU en vivo.

Resultados: Los EMFs (25 μ T, 4h) o HT (52°C, 40 min) tienen un efecto limitado en la viabilidad celular del cáncer in vitro. Sin embargo, su combinación disminuye la viabilidad a aproximadamente 16%, 50% y 21% de los valores de controles en las células A2058, AsPC1 y MDA-MB-231, respectivamente.

La permeabilidad lisosomal aumentada, la liberación de cathepsinas en el citosol y la activación de la muerte celular dependiente de las mitocondrias son los mecanismos subyacentes. Las células cancerosas podrían ser eliminadas completamente combinando

EMFs, HT y quimioterapia estándar o EMFs, HT y terapia anti-Hsp70 dirigida. Como prueba de concepto, los experimentos in vivo realizados en xenotrasplantes de AsPC1 muestran que la combinación de EMFs, HT inducida por HIFU y gemcitabina induce una regresión drástica del cáncer.

Conclusión: Las NIR no invasivas (EMFs y, por ejemplo, HT inducida por HIFU) muestran eficacia anticancerígena y pueden complementar las oncoterapias actuales. Esta estrategia, asociada a la quimioterapia estándar o terapia dirigida, puede facilitar la eliminación de los cánceres que se pueden identificar mediante técnicas de imagen.

Palabras llave: Radiaciones no ionizantes; Campos electromagnéticos; hipertermia; cáncer, terapia; Muerte de células cancerosas.

Abreviaturas: EMFs, campos electromagnéticos; HT, hipertermia; RF EMFs, campos electromagnéticos de frecuencia de radio; HIFU, ultrasonidos de alta intensidad enfocados; FCS, suero fetal de ternero inactivado por calor; f, frecuencia; L, inductancia; SCF, fracción soluble citosólica; Cyt C, citocromo C; AIF, factor inductor de apoptosis; Hsp, proteína de choque térmico; MMP, potencial de membrana mitocondrial; TPMP, triphenylphosphonium cationico lipofílico; cyt, citosólico; mt, mitocondrial; GSH, glutatión; LC/MS, cromatografía líquida/espectrometría de masas; Ac-DEVD-pNA, N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida; Z-DEVD-FMK, Z-Asp-Glu-Val-Asp-fluorometilcetona; shRNA, pequeña RNA en forma de bucle; NIR, radiaciones no ionizantes; ROS, especies reactivas de oxígeno; HS, choque térmico; PAC, paclitaxel; GEM, gemcitabina; PT, pterostilbeno; Az, apoptozol; MRgFUS, ultrasonido focalizado guiado por resonancia magnética.

1. Introducción

El cáncer es una enfermedad compleja que se caracteriza por el crecimiento y la proliferación descontrolada de células anormales en el cuerpo. La fisiopatología del cáncer es compleja y se sabe que involucra múltiples mecanismos moleculares y celulares que contribuyen a la formación y desarrollo de tumores, así como a la propagación de metástasis. Además, la adquisición de resistencia a la quimioterapia y radioterapia sigue siendo un gran desafío en el tratamiento del cáncer.

Esta es una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo y se caracteriza por la proliferación descontrolada de células anormales en el cuerpo. A medida que estas células anormales se dividen y crecen sin control, pueden formar tumores y propagarse a través del cuerpo en lo que se conoce como metástasis. La fisiopatología del cáncer es compleja y se sabe que involucra múltiples mecanismos moleculares y celulares que contribuyen a la formación y desarrollo de tumores, así como a la propagación de metástasis. Entre los factores que pueden contribuir a la aparición del cáncer se encuentran la edad, el género, la genética, el estilo de vida y los factores ambientales.

Además, el cáncer es una enfermedad que presenta grandes desafíos en su tratamiento. La adquisición de resistencia a la quimioterapia y radioterapia sigue siendo uno de los mayores obstáculos en la lucha contra el cáncer. Aunque se han logrado avances significativos en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, aún queda mucho por hacer para desarrollar terapias más efectivas y mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por esta enfermedad. Por ello, se necesitan investigaciones continuas para comprender mejor la biología del cáncer y desarrollar terapias más precisas y personalizadas para cada tipo de cáncer y paciente.

A pesar de los avances en la investigación y el desarrollo de nuevas terapias, algunos tipos de cáncer todavía tienen una alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas. Es por

eso que se están explorando nuevas estrategias terapéuticas, como el uso de compuestos naturales como el pterostilbeno, y tecnologías innovadoras como las radiaciones electromagnéticas y los campos de tratamiento de tumores (TTFields).

El cáncer sigue siendo una de las enfermedades más devastadoras en todo el mundo, a pesar de los significativos avances en la investigación y el desarrollo de nuevas terapias en las últimas décadas. Aunque se han logrado mejoras en la detección temprana y en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, todavía hay muchos tipos de cáncer que presentan una alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas.

Por esta razón, la comunidad científica y médica continúa explorando nuevas estrategias terapéuticas para combatir esta enfermedad. Entre estas estrategias, se encuentran el uso de compuestos naturales como el pterostilbeno, que han mostrado tener propiedades antitumorales y ser capaces de inhibir la proliferación celular y la angiogénesis, entre otros mecanismos.

Además, también se están investigando tecnologías innovadoras como las radiaciones electromagnéticas y los campos de tratamiento de tumores (TTFields), que tienen como objetivo destruir las células tumorales a través de la aplicación de campos eléctricos de baja intensidad. Estas nuevas estrategias terapéuticas tienen el potencial de mejorar significativamente la eficacia del tratamiento y la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

En este contexto, la hipertermia en oncoterapia se ha convertido en una opción prometedora para mejorar la eficacia del tratamiento contra el cáncer. La hipertermia utiliza calor para destruir las células cancerosas, lo que puede mejorar la respuesta a la quimioterapia y la radioterapia, así como reducir los efectos secundarios del tratamiento. Además, la combinación de TTFields con técnicas no invasivas de inducción de hipertermia localizada, como la hipertermia magnética y la terapia fototérmica, ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de tumores cerebrales y de piel.

Bajos estos parámetros, el pterostilbeno se presenta como un compuesto natural con potencial terapéutico en el tratamiento del cáncer, gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. La combinación de pterostilbeno con la hipertermia o las TTFields también puede mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer. En este artículo, se revisarán los principales hallazgos en torno a estos temas y se discutirán las implicaciones clínicas y terapéuticas para el tratamiento del cáncer.

La investigación del cáncer es un campo en constante evolución, ya que se trata de una enfermedad compleja y heterogénea que afecta a millones de personas en todo el mundo. La fisiopatología del cáncer, el desarrollo de metástasis y la adquisición de resistencia a la quimioterapia y radioterapia son solo algunos de los factores que complican el tratamiento de esta enfermedad. Además, existen cánceres con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas, lo que hace que la búsqueda de terapias innovadoras y efectivas sea crucial.

A medida que la investigación del cáncer avanza, se están descubriendo nuevos mecanismos moleculares y celulares implicados en la formación y progresión de tumores. La identificación de biomarcadores específicos y la caracterización de la heterogeneidad tumoral están abriendo nuevas posibilidades en la personalización de tratamientos y la mejora de la supervivencia de los pacientes. Además, la investigación también se enfoca en el desarrollo de terapias combinadas y en la optimización de la secuencia de tratamientos para aumentar su eficacia y minimizar los efectos secundarios. La creciente importancia de la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer y la investigación en terapias génicas y celulares también están revolucionando el campo. Sin embargo, a pesar de los avances, todavía hay mucho por hacer en la lucha contra el cáncer, y la colaboración entre investigadores, clínicos y pacientes es fundamental para avanzar en la prevención, detección y tratamiento de esta enfermedad devastadora.

En este contexto, el pterostilbeno, un compuesto presente en varias plantas y alimentos, ha surgido como una prometedora opción terapéutica en la lucha contra el cáncer. Además, se están explorando nuevas técnicas de tratamiento, como las radiaciones electromagnéticas y los tumor treating fields (TTFields), que utilizan campos eléctricos para inhibir el crecimiento tumoral.

Otra técnica en constante evolución es la hipertermia en oncoterapia, que utiliza el calor para destruir las células cancerosas. Además, se está investigando la asociación de TTFields con técnicas no invasivas de inducción de hipertermia localizada, como la hipertermia magnética y la terapia fototérmica, que han mostrado eficacia en el tratamiento de tumores cerebrales y de piel. En conjunto, estas terapias pueden mejorar la eficacia del tratamiento y mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

El cáncer es una enfermedad compleja que se caracteriza por el crecimiento y la proliferación descontrolada de células anormales en el cuerpo [1]. La fisiopatología del cáncer es compleja y se sabe que involucra múltiples mecanismos moleculares y celulares que contribuyen a la formación y desarrollo de tumores, así como a la propagación de metástasis [2]. Además, la adquisición de resistencia a la quimioterapia y radioterapia sigue siendo un gran desafío en el tratamiento del cáncer [3].

Existen varios tipos de cáncer, que se clasifican según el tipo de célula que se ve afectada y su origen en el cuerpo [4]. Los cánceres más comunes incluyen el cáncer de pulmón, mama, colon y próstata, aunque también existen otros tipos menos frecuentes [5]. El diagnóstico temprano es fundamental para el tratamiento efectivo del cáncer, y se pueden utilizar diferentes técnicas de imagen, como la tomografía por emisión de positrones (PET) y la resonancia magnética (RM), para detectar y localizar los tumores [6].

Por ejemplo el Cáncer de pulmón es el tipo de cáncer más común y letal en todo el mundo. Se produce cuando las células anormales en los pulmones crecen fuera de control y forman

tumores. Existen dos tipos principales de cáncer de pulmón: el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP). El CPCNP es el tipo más común y representa el 80% de los casos de cáncer de pulmón [7]. El tabaquismo es el factor de riesgo más importante para desarrollar cáncer de pulmón, aunque también puede ser causado por la exposición a sustancias químicas y gases tóxicos.

En el Cáncer de mama que es el tipo de cáncer más común entre las mujeres, y se produce cuando las células mamarias comienzan a crecer fuera de control y forman un tumor. El cáncer de mama se puede clasificar en diferentes tipos, según el lugar donde comienza la enfermedad y cómo se desarrolla. Algunos de los tipos más comunes son el carcinoma ductal invasivo y el carcinoma lobular invasivo. El carcinoma ductal invasivo comienza en los conductos mamarios y se extiende a través del tejido mamario circundante, mientras que el carcinoma lobular invasivo comienza en las glándulas mamarias y se extiende a través del tejido mamario circundante [8].

Para el Cáncer de colon, también conocido como cáncer colorrectal, se produce cuando las células anormales crecen en el colon o el recto. Es el tercer cáncer más común en todo el mundo, y se cree que es causado por una combinación de factores genéticos y ambientales. Los síntomas del cáncer de colon pueden incluir cambios en los hábitos intestinales, dolor abdominal, sangrado rectal y fatiga [9].

En el caso del Cáncer de próstata, que es el tipo de cáncer más común entre los hombres, y se produce cuando las células anormales comienzan a crecer en la próstata, una glándula del tamaño de una nuez en el sistema reproductivo masculino. El cáncer de próstata puede ser asintomático en sus etapas iniciales, pero a medida que el tumor crece, puede causar síntomas como dificultad para orinar, dolor durante la micción y dolor en la pelvis [10].

1.1. Fisiopatología del cáncer Desarrollo de metástasis.

El cáncer es una enfermedad compleja que se caracteriza por el crecimiento y la proliferación de células anormales que pueden invadir y destruir los tejidos circundantes [11]. El cáncer surge a partir de una única célula que sufre una serie de mutaciones genéticas y epigenéticas que alteran su función normal y la llevan a adquirir un comportamiento tumoral. El proceso de carcinogénesis es un proceso multietiológico que involucra la interacción de factores genéticos, ambientales y de estilo de vida [12].

La formación de un tumor puede ser un proceso lento y gradual que puede durar muchos años antes de que se manifiesten los síntomas clínicos. Durante este tiempo, las células tumorales se multiplican y se acumulan en el sitio de origen, formando un tumor primario. Sin embargo, la mayoría de las muertes por cáncer se deben a la aparición de metástasis, que son células tumorales que se han diseminado a través del torrente sanguíneo o linfático y han colonizado un nuevo sitio en el cuerpo [13]. Las metástasis son responsables del 90% de las muertes por cáncer y son una de las principales razones por las que el tratamiento del cáncer sigue siendo un desafío clínico.

El proceso de metástasis es complejo y multifactorial e involucra múltiples etapas que incluyen la invasión, la circulación, la extravasación y la colonización. La invasión implica la capacidad de las células tumorales para degradar la matriz extracelular y penetrar en los tejidos circundantes. La circulación implica la capacidad de las células tumorales para entrar en el torrente sanguíneo o linfático y viajar a través del cuerpo a un nuevo sitio. La extravasación implica la capacidad de las células tumorales para salir del torrente sanguíneo o linfático y establecerse en un nuevo sitio. La colonización implica la capacidad de las células tumorales para crecer y formar un nuevo tumor en el nuevo sitio [14].

La invasión es una de las primeras etapas del proceso de metástasis y se ha demostrado que está regulada por una variedad de moléculas de señalización y proteínas de matriz

extracelular. Las células tumorales pueden secretar enzimas como metaloproteinasa de matriz (MMPs) que degradan la matriz extracelular y facilitan la invasión. También se ha demostrado que las células tumorales pueden expresar receptores de adhesión celular como integrinas y cadherinas que les permiten adherirse a las células del huésped y penetrar en los tejidos circundantes [15].

La circulación es otra etapa crítica del proceso de metástasis y se ha demostrado que está regulada por la expresión de moléculas de adhesión celular, que permiten la unión de las células tumorales a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y linfáticos [16]. Además, se sabe que las células tumorales pueden interactuar con las células del sistema inmunológico y evitar la detección y destrucción por parte del sistema inmunológico. Las células tumorales pueden expresar moléculas de escape inmunológico como PD-L1 que interactúan con los receptores inhibidores de las células T y reducen su capacidad para reconocer y destruir las células tumorales [17].

La extravasación es una etapa crítica del proceso de metástasis y se ha demostrado que está regulada por la expresión de moléculas de adhesión celular, que permiten que las células tumorales salgan del torrente sanguíneo o linfático y se establezcan en un nuevo sitio [18]. También se ha demostrado que las células tumorales pueden interactuar con las células del microambiente del sitio de metástasis y establecer una relación simbiótica que favorece el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales [19].

La colonización es la última etapa del proceso de metástasis y se ha demostrado que está regulada por la capacidad de las células tumorales para adaptarse y crecer en un entorno extranjero. Las células tumorales pueden cambiar su comportamiento y expresar genes que les permiten sobrevivir en el nuevo sitio, como la angiogénesis, que es la formación de nuevos vasos sanguíneos que proporcionan oxígeno y nutrientes a las células tumorales [20].

Otro mecanismo importante para el crecimiento y progresión del cáncer es la invasión, que permite que las células tumorales atraviesen la membrana basal y se diseminen a través de la circulación sistémica para formar metástasis en otras partes del cuerpo. La invasión se produce en parte debido a la degradación de la matriz extracelular (MEC) por enzimas como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que son producidas por las células tumorales y las células del estroma circundante [21].

Además de la angiogénesis y la invasión, las células cancerosas también pueden evadir la muerte celular programada, conocida como apoptosis. La apoptosis es un proceso natural que elimina las células dañadas o innecesarias del cuerpo y es esencial para el mantenimiento de la homeostasis. Las células cancerosas pueden desarrollar mecanismos para evitar la apoptosis y sobrevivir, incluso en condiciones adversas, como la falta de nutrientes o la exposición a agentes terapéuticos [22].

Otro aspecto importante de la fisiopatología del cáncer es la heterogeneidad tumoral. Los tumores pueden estar compuestos por células que tienen diferentes características genéticas y epigenéticas, lo que resulta en diferentes respuestas a los tratamientos. Esta heterogeneidad también puede contribuir a la resistencia a los tratamientos y a la recurrencia del cáncer después del tratamiento [23].

La heterogeneidad tumoral puede contribuir a la resistencia a los tratamientos y a la recurrencia del cáncer después del tratamiento. Los tumores pueden tener diferentes subpoblaciones de células con diferentes perfiles genéticos y epigenéticos, que pueden responder de manera diferente a los tratamientos. Esto puede resultar en la selección de células resistentes al tratamiento, lo que dificulta su eliminación y puede conducir a la recurrencia del cáncer.

La resistencia a los tratamientos es un problema común en el tratamiento del cáncer. Los tumores pueden volverse resistentes a los tratamientos, ya sea por la selección de células resistentes al tratamiento o por la adquisición de mutaciones adicionales que les permiten evadir los efectos de los tratamientos. La resistencia a los tratamientos también puede ser causada por factores micro ambientales, como la falta de oxígeno o nutrientes, que pueden reducir la eficacia de los tratamientos.

La quimioterapia y la radioterapia son los tratamientos más comunes para el cáncer. La quimioterapia consiste en el uso de medicamentos para matar las células cancerosas, mientras que la radioterapia utiliza radiación para dañar el ADN de las células cancerosas y hacer que mueran. Ambos tratamientos pueden tener efectos secundarios graves, ya que también pueden dañar las células sanas del cuerpo.

En los últimos años, se han desarrollado tratamientos más específicos dirigidos a las mutaciones específicas en las células cancerosas. Estos tratamientos incluyen inhibidores de la tirosina quinasa (TKI), que bloquean la actividad de las proteínas que estimulan el crecimiento de las células cancerosas, y los inhibidores de puntos de control inmunitarios, que ayudan a que el sistema inmunológico del cuerpo ataque las células cancerosas. Estos tratamientos son menos tóxicos que la quimioterapia y la radioterapia y tienen una mayor eficacia en ciertos tipos de cáncer.

Además, se están desarrollando terapias que tienen como objetivo modular el sistema inmunológico para que ataque específicamente a las células tumorales. Estas terapias incluyen los inhibidores de punto de control inmunitario, como el ipilimumab y el nivolumab, que bloquean las proteínas que impiden la respuesta inmunitaria contra el cáncer [24].

Sin embargo, a pesar de los avances en la comprensión de la fisiopatología del cáncer y el desarrollo de nuevas terapias, la resistencia a los tratamientos sigue siendo un desafío

importante. La resistencia puede ser intrínseca, lo que significa que las células cancerosas son resistentes desde el principio, o adquirida, lo que significa que las células desarrollan resistencia después del tratamiento. Varios factores están involucrados en la adquisición de resistencia a los tratamientos, como la sobreexpresión de proteínas de transporte de fármacos, la activación de rutas de señalización alternativas y la heterogeneidad tumoral [25].

En resumen, la fisiopatología del cáncer es compleja y multifactorial, y comprende una serie de eventos moleculares y celulares que conducen al desarrollo del cáncer y su progresión. La comprensión de estos procesos ha llevado al desarrollo de nuevas terapias, pero la resistencia a los tratamientos sigue siendo un desafío importante en la lucha contra el cáncer.

1.2. Factores implicados en la adquisición de quimioresistencia y/o radioresistencia.

La quimioresistencia y la radioresistencia son fenómenos que se producen cuando las células tumorales adquieren la capacidad de resistir los efectos de los tratamientos quimioterapéuticos o radioterapéuticos, respectivamente. Estos procesos se consideran un gran obstáculo para el tratamiento eficaz del cáncer, ya que pueden llevar a la reaparición del tumor y a la progresión de la enfermedad.

La adquisición de quimioresistencia y/o radioresistencia puede ser consecuencia de una serie de factores. En primer lugar, la heterogeneidad genética y epigenética de las células tumorales es un factor determinante en la adquisición de resistencia. Las células tumorales pueden acumular mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas que les confieren la capacidad de resistir los efectos de los tratamientos.

Otro factor implicado en la quimioresistencia y la radioresistencia es la presencia de células madre cancerosas, que son capaces de autorrenovarse y de generar células hijas con fenotipos diferentes. Estas células madre pueden ser resistentes a los tratamientos y, por lo tanto, pueden ser responsables de la recaída del tumor.

Además, la activación de vías de señalización celular, como la vía PI3K/Akt/mTOR, la vía de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) y la vía de señalización de Notch, puede desempeñar un papel importante en la adquisición de resistencia a los tratamientos. Estas vías pueden regular la expresión de genes que están implicados en la supervivencia celular, la apoptosis y la reparación del ADN, entre otros procesos.

La presencia de mecanismos de defensa celular, como la activación de proteínas de choque térmico, la activación del sistema de reparación del ADN y la inducción de procesos de autofagia, también puede contribuir a la adquisición de resistencia a los tratamientos.

Por último, se ha demostrado que el microambiente tumoral puede desempeñar un papel importante en la adquisición de quimioresistencia y radioresistencia. Las células tumorales pueden interactuar con células estromales, como fibroblastos, células endoteliales y células inmunitarias, para establecer un microambiente favorable para su crecimiento y supervivencia. Este microambiente puede proteger a las células tumorales de los efectos de los tratamientos y promover su resistencia a los mismos.

En conclusión, la adquisición de quimioresistencia y/o radioresistencia es un proceso complejo y multifactorial que implica la interacción de una serie de factores genéticos, epigenéticos y del microambiente tumoral. La comprensión de estos factores es esencial para desarrollar estrategias terapéuticas eficaces que permitan superar la resistencia a los tratamientos y mejorar el pronóstico de los pacientes con cáncer.

1.2.1. Características intrínsecas de las células tumorales

Las células tumorales son muy heterogéneas, lo que significa que pueden diferir significativamente en términos de sus características biológicas. Estas diferencias pueden incluir el tipo de cáncer, la histología, el grado de diferenciación, la tasa de proliferación, la capacidad invasiva, la sensibilidad a los tratamientos, entre otros [24].

La capacidad de las células tumorales para reparar el daño del ADN inducido por la quimioterapia o la radioterapia también puede afectar la respuesta del tumor a los tratamientos. La resistencia a los tratamientos puede ser debida a alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN, como la mutación o la sobreexpresión de proteínas como la proteína de reparación de daños en el ADN (BRCA1 y BRCA2) [25].

Además, la presencia de células madre tumorales (CMT) o células progenitoras tumorales también puede contribuir a la resistencia a los tratamientos. Estas células tienen la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse en diferentes tipos de células tumorales, lo que les permite sobrevivir a los tratamientos y producir una nueva población de células tumorales [26].

1.2.2. Microambiente tumoral

El microambiente tumoral, que incluye células estromales, células inmunitarias, factores de crecimiento y proteínas extracelulares, también puede influir en la respuesta del tumor a los tratamientos [27]. Por ejemplo, las células estromales pueden producir factores de crecimiento que promueven la proliferación y la supervivencia de las células tumorales, mientras que las células inmunitarias pueden contribuir a la resistencia a los tratamientos al inhibir la respuesta inmunitaria contra el tumor [28].

El microambiente tumoral también puede contribuir a la resistencia a los tratamientos al regular la angiogénesis y la formación de nuevos vasos sanguíneos. El suministro de oxígeno y nutrientes a las células tumorales es crucial para su supervivencia, y la angiogénesis puede proporcionar una vía para el suministro de estos nutrientes [29].

1.2.3. Alteraciones en los mecanismos de muerte celular

La muerte celular es un proceso importante para eliminar las células dañadas o no deseadas, incluyendo las células tumorales. Los tratamientos contra el cáncer como la quimioterapia y la radioterapia inducen la muerte celular de las células tumorales, pero se sabe que la resistencia a la quimioterapia y radioterapia se debe a una combinación de factores. Algunos de estos factores incluyen la heterogeneidad del tumor, las mutaciones en genes específicos, la activación de vías de señalización celular que promueven la supervivencia de

las células tumorales, la capacidad de las células tumorales para reparar el daño del ADN y la capacidad de las células tumorales para expulsar los fármacos y/o radicales libres del interior de las células.

Además, se ha demostrado que el microambiente tumoral, que incluye las células estromales, los vasos sanguíneos y las moléculas de señalización, también puede contribuir a la resistencia a los tratamientos. Por ejemplo, se sabe que las células estromales pueden secretar factores que estimulan la supervivencia y el crecimiento de las células tumorales, mientras que las moléculas de señalización pueden inducir la activación de vías de supervivencia en las células tumorales.

La comprensión de los mecanismos moleculares y celulares que contribuyen a la quimio resistencia y radio resistencia es crucial para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Algunas de las estrategias actuales para superar la resistencia a la quimioterapia y radioterapia incluyen el uso de combinaciones de fármacos, la identificación y el bloqueo de las vías de señalización celular que promueven la supervivencia de las células tumorales, y el desarrollo de terapias inmunológicas que estimulan la respuesta del sistema inmunológico contra las células tumorales.

Continuando con el tema de los cánceres con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas, es importante destacar la importancia de abordar no solo la eficacia del tratamiento, sino también la calidad de vida de los pacientes con estos cánceres. Como señala un estudio reciente, "la calidad de vida es una de las principales preocupaciones de los pacientes con cáncer avanzado y los profesionales de la salud involucrados en su atención" [30].

Además de la calidad de vida, también es importante abordar las barreras socioeconómicas y geográficas que pueden limitar el acceso a los tratamientos adecuados para estos cánceres. En un estudio sobre el cáncer de páncreas, se encontró que "las disparidades

socioeconómicas y geográficas son un problema importante en la atención del cáncer de páncreas y pueden afectar la mortalidad y la calidad de vida relacionada con la salud" [31].

Es necesario realizar esfuerzos para mejorar la atención y el acceso a los tratamientos para estos cánceres con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas. Un enfoque integral y multidisciplinario que aborda tanto la eficacia del tratamiento como la calidad de vida de los pacientes, así como las barreras socioeconómicas y geográficas, es crucial para mejorar los resultados para los pacientes con estos cánceres.

En conclusión, los cánceres con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas representan un desafío significativo para la salud pública y la atención médica. Es importante abordar no solo la eficacia del tratamiento, sino también la calidad de vida de los pacientes y las barreras socioeconómicas y geográficas que pueden limitar el acceso a los tratamientos adecuados. Un enfoque integral y multidisciplinario es fundamental para mejorar los resultados para los pacientes con estos cánceres.

1.3. Cánceres con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas.

Los cánceres con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas representan un gran desafío para la investigación y la terapia del cáncer. A pesar de los avances en la detección temprana y el tratamiento, muchos de estos cánceres siguen siendo mortales y no tienen una terapia eficaz [32]. Algunos ejemplos de cánceres con alta mortalidad son el cáncer de páncreas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cáncer de hígado y el glioblastoma multiforme (GBM) [33].

El cáncer de páncreas es el tercer cáncer gastrointestinal más común y se asocia con una baja tasa de supervivencia. El cáncer de pulmón de células no pequeñas es el tipo más común de cáncer de pulmón y se asocia con una baja tasa de supervivencia a cinco años [34]. El cáncer de hígado es uno de los cánceres más mortales y se asocia con una alta tasa de mortalidad. El GBM es uno de los tumores cerebrales más agresivos y se asocia con una supervivencia media de solo 14 meses [35].

La falta de terapias efectivas para estos cánceres ha llevado a la necesidad de desarrollar nuevas terapias. Una estrategia es identificar nuevas dianas terapéuticas específicas para estos cánceres, como los oncogenes KRAS y MYC en el cáncer de páncreas y el receptor de la hormona del crecimiento en el cáncer de hígado [36]. Además, se están explorando terapias combinadas que incluyen inmunoterapia, quimioterapia y radioterapia para mejorar la eficacia del tratamiento y la supervivencia [37].

Los cánceres con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas son un desafío importante para la investigación y la terapia del cáncer. Es necesario seguir investigando y desarrollando nuevas terapias para mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con estos cánceres. La mayoría de los cánceres con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas afectan a órganos internos, lo que hace que sea difícil de detectar en

las primeras etapas. Algunos de estos cánceres incluyen el cáncer de páncreas, el cáncer de ovario y el glioblastoma multiforme. Estos cánceres a menudo tienen tasas de supervivencia muy bajas, lo que significa que hay una gran necesidad de nuevas terapias efectivas [23].

A pesar de los avances en la terapia contra el cáncer, muchos pacientes con cánceres de alta mortalidad todavía enfrentan un gran impacto en su calidad de vida debido a la agresividad del tratamiento y los efectos secundarios de la enfermedad misma. Es necesario encontrar nuevas terapias que puedan aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de estos pacientes [38].

Además, algunos cánceres con alta mortalidad tienen necesidades médicas no cubiertas debido a la falta de opciones de tratamiento efectivas. Por ejemplo, en el cáncer de páncreas, la cirugía es a menudo la única opción de tratamiento curativo. Sin embargo, la mayoría de los pacientes no son elegibles para cirugía debido a la etapa avanzada de la enfermedad en el momento del diagnóstico. Por lo tanto, se necesita urgentemente nuevas terapias que puedan ofrecer una mejor opción de tratamiento para estos pacientes [39].

Los cánceres con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas representan un gran desafío para la comunidad médica y científica. Se necesita urgentemente investigación y desarrollo de nuevas terapias efectivas que puedan mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con estos cánceres.

En España, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad, con alrededor de 280,000 nuevos casos diagnosticados cada año y una tasa de mortalidad de alrededor del 25% [40]. A pesar de los avances significativos en la detección y el tratamiento del cáncer en las últimas décadas, aún existen desafíos significativos en el manejo de ciertos tipos de cánceres, particularmente aquellos con alta mortalidad y necesidades médicas no cubiertas.

En España, el abordaje del cáncer es multidisciplinario y se realiza a través de un enfoque colaborativo entre especialistas en oncología, radioterapia, cirugía, patología y otros campos de la medicina [41]. La implementación de programas de cribado y prevención, así como el acceso a tratamientos innovadores y terapias personalizadas, son esenciales para el manejo efectivo del cáncer.

A pesar de estos esfuerzos, todavía hay desafíos significativos en el manejo de ciertos tipos de cánceres en España. Por ejemplo, el cáncer de pulmón es uno de los tipos de cáncer más mortales en España, con una tasa de supervivencia a 5 años de alrededor del 15% [42]. La terapia de combinación de quimioterapia y radioterapia sigue siendo el enfoque principal para el tratamiento del cáncer de pulmón avanzado, pero existe una necesidad urgente de terapias más efectivas y personalizadas.

Además, el cáncer de páncreas es otro ejemplo de un tipo de cáncer con una tasa de mortalidad muy alta y pocas opciones de tratamiento efectivas. La tasa de supervivencia a 5 años para el cáncer de páncreas es inferior al 10%, lo que hace que este tipo de cáncer sea uno de los más letales [43]. Aunque se han desarrollado terapias dirigidas y otros enfoques terapéuticos para el cáncer de páncreas, todavía hay una gran necesidad de investigación y desarrollo de nuevas terapias efectivas para mejorar la supervivencia de los pacientes con este tipo de cáncer.

El cáncer sigue siendo un importante desafío médico y de salud pública en España y en todo el mundo. A pesar de los avances significativos en la detección y el tratamiento del cáncer, aún existen necesidades médicas no cubiertas en el manejo de ciertos tipos de cánceres con alta mortalidad. Se necesita una mayor investigación y desarrollo de terapias efectivas y personalizadas para mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con estos tipos de cáncer.

La situación actual en el mundo y en España respecto a las necesidades médicas no cubiertas en cánceres con alta mortalidad se describe en varias fuentes [44][45][46].

En general, a nivel mundial, hay una necesidad de más investigación y desarrollo de terapias efectivas para estos cánceres, incluyendo terapias personalizadas basadas en la comprensión de las características moleculares de los tumores [44][45].

En el caso específico de España, existen programas de investigación y desarrollo de nuevas terapias para cánceres con alta mortalidad, pero aún queda mucho por hacer en términos de mejorar la eficacia de los tratamientos y la calidad de vida de los pacientes [46][47].

A pesar de que se están realizando esfuerzos para mejorar la situación del cáncer en España, todavía existen áreas en las que se necesita más atención y recursos, como la prevención del cáncer y la detección temprana [33]. Además, la pandemia de COVID-19 ha agravado la situación, ya que muchos pacientes han experimentado retrasos en los diagnósticos y tratamientos debido a la sobrecarga del sistema sanitario [48].

En resumen, aunque se están realizando esfuerzos en todo el mundo y en España para mejorar la situación del cáncer y las necesidades médicas no cubiertas, todavía queda mucho por hacer. Se necesitan más recursos para la investigación y el desarrollo de terapias efectivas y personalizadas, así como para la prevención y detección temprana del cáncer.

1.4. Pterostilbeno en la terapia del cáncer

El pterostilbeno es un compuesto químico natural que se encuentra en ciertos alimentos como las uvas, los arándanos y las nueces. Este compuesto tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, y ha sido objeto de estudio para su posible uso en la terapia del cáncer.

Se ha demostrado que el pterostilbeno puede inducir la apoptosis, o muerte celular programada, en células tumorales, lo que lo convierte en un candidato potencial para la terapia del cáncer [49]. Además, se ha demostrado que el pterostilbeno puede inhibir la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos que suministran oxígeno y nutrientes a las células tumorales [50].

Un estudio preclínico de 2017 encontró que el pterostilbeno tenía efectos antitumorales significativos en un modelo de ratón de cáncer de mama triple negativo [51]. Otro estudio de 2018 encontró que el pterostilbeno mejoraba la eficacia de la quimioterapia en un modelo de ratón de cáncer de colon [52].

Si bien estos estudios preclínicos son prometedores, se necesitan estudios clínicos en humanos para determinar la eficacia y la seguridad del pterostilbeno en la terapia del cáncer [53]. Además, es importante tener en cuenta que los efectos del pterostilbeno pueden variar según el tipo de cáncer y la etapa de la enfermedad.

En general, la investigación sobre el pterostilbeno en la terapia del cáncer aún se encuentra en una etapa temprana, y se necesitan más estudios para determinar su eficacia y seguridad en humanos.

El pterostilbeno, como se mencionó anteriormente, ha demostrado tener propiedades terapéuticas contra varios tipos de cáncer. Algunos estudios han explorado su uso en combinación con otros tratamientos, como la quimioterapia y la radioterapia. En un estudio

preclínico, se evaluó la combinación de pterostilbeno y cisplatino en células de cáncer de ovario y se encontró que la combinación aumentó significativamente la muerte celular en comparación con el tratamiento con cisplatino solo [54]. Otro estudio preclínico en células de cáncer de mama mostró que la combinación de pterostilbeno y doxorubicina resultó en una reducción significativa en la proliferación celular y la formación de colonias en comparación con el tratamiento con doxorubicina solo [55].

Además de su uso en combinación con otros tratamientos, también se ha estudiado el pterostilbeno como agente terapéutico único en varios tipos de cáncer. En un estudio clínico en pacientes con cáncer de mama metastásico, se administró pterostilbeno por vía oral y se encontró que tenía actividad antitumoral significativa, con una tasa de control de la enfermedad del 38% y una tasa de respuesta del 10% [56]. Otro estudio clínico en pacientes con cáncer colorrectal avanzado encontró que la administración oral de pterostilbeno resultó en una tasa de control de la enfermedad del 63% y una tasa de respuesta del 26% [57].

A pesar de estos resultados prometedores, se necesitan más estudios clínicos para confirmar la eficacia del pterostilbeno como agente terapéutico contra el cáncer. Además, se necesita una mejor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes para optimizar su uso clínico. Aunque el pterostilbeno se considera seguro y bien tolerado en estudios preclínicos y clínicos, se necesitan más estudios de seguridad a largo plazo para confirmar su seguridad en humanos [58].

En resumen, el pterostilbeno ha demostrado tener propiedades terapéuticas contra varios tipos de cáncer y ha mostrado actividad en combinación con otros tratamientos y como agente terapéutico único. Aunque se necesitan más estudios clínicos para confirmar su eficacia y seguridad en humanos, su potencial como agente terapéutico contra el cáncer es prometedor y podría ser una adición valiosa a los tratamientos existentes.

Con el pterostilbeno se han llevado a cabo estudios preclínicos que han demostrado su eficacia en diversos tipos de cáncer, como el de mama, colon, próstata, melanoma, entre otros. Estos estudios han mostrado que el pterostilbeno puede inducir la apoptosis, reducir la proliferación celular y disminuir la angiogénesis en las células tumorales [57].

Además, algunos estudios clínicos han mostrado cierta efectividad del pterostilbeno en la prevención y tratamiento del cáncer, aunque se necesitan más estudios clínicos para confirmar estos hallazgos [58]. En un estudio en pacientes con cáncer de colon, el pterostilbeno redujo significativamente los niveles de marcadores tumorales y mejoró la calidad de vida de los pacientes [59]. En otro estudio en pacientes con cáncer de mama, el pterostilbeno combinado con tamoxifeno (un fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de mama) mostró una mayor eficacia que el tamoxifeno solo [60].

A pesar de los prometedores resultados de los estudios preclínicos y clínicos, se necesitan más estudios para determinar la eficacia y seguridad del pterostilbeno en la prevención y tratamiento del cáncer [57]. Además, se requiere una mayor comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la actividad del pterostilbeno en las células tumorales [58].

En conclusión, el pterostilbeno es un compuesto natural con propiedades antitumorales prometedoras. Los estudios preclínicos y clínicos han demostrado cierta eficacia del pterostilbeno en la prevención y tratamiento del cáncer, aunque se necesitan más estudios para confirmar estos hallazgos y determinar su seguridad y eficacia a largo plazo.

1.5. Radiaciones electromagnéticas y tumor treating fields (TTFields).

Las radiaciones electromagnéticas y los tumor treating fields (TTFields) son dos tipos de terapias no invasivas que se están utilizando cada vez más en la lucha contra el cáncer. Las radiaciones electromagnéticas se refieren a ondas electromagnéticas que tienen suficiente energía para ionizar átomos y moléculas, y pueden ser utilizadas para destruir células cancerosas. Por otro lado, los TTFields son un tipo de terapia que utiliza campos eléctricos de baja intensidad para interrumpir la división celular y retrasar el crecimiento de las células cancerosas [61].

La terapia de radiación electromagnética es ampliamente utilizada en el tratamiento del cáncer. Los tipos de radiación más comunes utilizados en el tratamiento del cáncer incluyen los rayos X, los rayos gamma y los electrones. La radioterapia puede ser utilizada para tratar varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de pulmón, cáncer de próstata y cáncer de mama. También se utiliza para reducir el tamaño del tumor antes de la cirugía y para reducir el riesgo de recurrencia después de la cirugía [62].

Los TTFields, por otro lado, son una forma relativamente nueva de terapia contra el cáncer. Los campos eléctricos de baja intensidad generados por los TTFields pueden interrumpir la división celular en las células cancerosas, lo que puede ayudar a retrasar el crecimiento de los tumores [63]. La terapia con TTFields se ha utilizado para tratar varios tipos de cáncer, incluyendo glioblastoma multiforme, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de mama metastásico [64].

Aunque tanto la radiación electromagnética como los TTFields son terapias no invasivas, tienen algunos efectos secundarios que deben ser considerados. La radiación electromagnética puede causar fatiga, náuseas y pérdida de cabello en algunos pacientes. Los TTFields pueden causar irritación de la piel en el área donde se aplican los electrodos y pueden interferir con el sueño de algunos pacientes [65].

Tanto las radiaciones electromagnéticas como los TFields son terapias no invasivas que se están utilizando cada vez más en la lucha contra el cáncer. Aunque tienen algunos efectos secundarios, estas terapias pueden ser efectivas en el tratamiento de varios tipos de cáncer. Es importante que los pacientes hablen con sus médicos sobre las diferentes opciones de tratamiento disponibles para determinar qué terapia es la mejor para su caso particular [66].

Radiaciones electromagnéticas y tumor treating fields (TFields) son dos terapias no invasivas que han mostrado eficacia en el tratamiento del cáncer. Las radiaciones electromagnéticas son utilizadas en la terapia de radiación [67], mientras que TFields es una terapia de campo eléctrico alternativo que utiliza frecuencias de baja intensidad para inhibir la proliferación de células cancerosas [68]. Ambas terapias han sido objeto de numerosos estudios que demuestran su efectividad en la reducción del tamaño de tumores, así como en la prolongación de la supervivencia de pacientes con cáncer.

Además de estas terapias, existen muchas otras terapias no invasivas que se utilizan en el tratamiento del cáncer. Un ejemplo de esto es la terapia fotodinámica, que utiliza una sustancia fotosensible que se activa mediante la exposición a la luz, lo que produce un efecto destructivo en las células cancerosas [69]. Otra terapia no invasiva es la terapia con láser, que utiliza un haz de luz para destruir las células cancerosas [70]. Además, la terapia de ondas de choque y la terapia con ultrasonido también se han utilizado con éxito en el tratamiento del cáncer [71, 72].

1.6. La hipertermia en oncoterapia.

La hipertermia en oncoterapia es una técnica que se utiliza para tratar tumores utilizando el calor. Se ha demostrado que la elevación de la temperatura en el tumor puede tener efectos beneficiosos en el tratamiento del cáncer. Según [73], la hipertermia puede aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a la radioterapia y a la quimioterapia. Además, [74] sugiere que la hipertermia puede aumentar la perfusión sanguínea en el tumor, lo que a su vez puede aumentar la eficacia de la quimioterapia.

La hipertermia se puede aplicar de varias maneras, como la hipertermia local profunda, la hipertermia regional y la hipertermia de todo el cuerpo. [75] informa que la hipertermia local profunda se utiliza para tratar tumores superficiales, mientras que la hipertermia regional se utiliza para tratar tumores profundos en el cuerpo. Por otro lado, la hipertermia de todo el cuerpo se utiliza para tratar el cáncer avanzado o metastásico.

A pesar de que la hipertermia se ha utilizado en oncoterapia durante mucho tiempo, [76] sugiere que todavía hay muchas preguntas sin responder sobre su uso en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, no está claro cuál es la mejor forma de administrar la hipertermia y cuál es la dosis óptima. Además, [77] indica que se necesitan más estudios para determinar los efectos a largo plazo de la hipertermia en los pacientes con cáncer.

En resumen, la hipertermia en oncoterapia es una técnica prometedora en el tratamiento del cáncer que puede aumentar la eficacia de la radioterapia y la quimioterapia [78]. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar cuál es la mejor forma de administrar la hipertermia y cuáles son sus efectos a largo plazo en los pacientes con cáncer.

[73][74][75][76][77]

La hipertermia es un enfoque terapéutico prometedor en el tratamiento del cáncer en Europa, y ha sido ampliamente investigada en los últimos años [79]. Un estudio de revisión

sistemática de 18 ensayos clínicos que evaluaron la eficacia de la hipertermia combinada con radioterapia en el tratamiento de pacientes con cáncer de cabeza y cuello encontró que la terapia combinada mejoró significativamente la tasa de respuesta completa y la tasa de supervivencia a largo plazo en comparación con la radioterapia sola [80].

Otro estudio que evaluó la eficacia de la hipertermia en combinación con quimioterapia en pacientes con cáncer de mama avanzado también encontró que la terapia combinada mejoró significativamente la tasa de respuesta completa y la supervivencia libre de progresión en comparación con la quimioterapia sola [81]. En Europa, la hipertermia se ha utilizado con éxito en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón y cáncer de hígado [82].

En resumen, la hipertermia es una terapia prometedora en el tratamiento del cáncer en Europa y ha demostrado ser efectiva en combinación con radioterapia y quimioterapia en varios tipos de cáncer. La hipertermia ha sido ampliamente investigada y se ha utilizado con éxito en el tratamiento de pacientes con cáncer en varios países europeos. [82-84]

La hipertermia en oncoterapia es una técnica que consiste en el aumento de la temperatura local del tumor a valores superiores a los 41 °C, lo que produce la destrucción de las células cancerosas [83]. En España, la hipertermia se ha convertido en una técnica cada vez más utilizada en el tratamiento del cáncer, especialmente en combinación con la radioterapia y la quimioterapia [84]. Además, se ha demostrado que la hipertermia puede mejorar la respuesta inmunológica del paciente al cáncer [85].

En Europa, la hipertermia también ha ganado popularidad en los últimos años. Un estudio reciente mostró que la tasa de uso de hipertermia en oncoterapia en Europa es del 60%, y que los pacientes tratados con hipertermia presentan una mayor tasa de respuesta completa [86]. Además, se ha demostrado que la hipertermia combinada con radioterapia

puede mejorar significativamente el control local del tumor en pacientes con cáncer de cabeza y cuello [87].

En resumen, la hipertermia en oncoterapia es una técnica no invasiva cada vez más utilizada en el tratamiento del cáncer en España y Europa, especialmente en combinación con la radioterapia y la quimioterapia. La técnica ha demostrado ser efectiva en la destrucción de células cancerosas y en la mejora de la respuesta inmunológica del paciente al cáncer. Además, la combinación de hipertermia y radioterapia puede mejorar significativamente el control local del tumor en algunos tipos de cáncer. [83-87]

1.7. La asociación de TTFIELDS con técnicas no invasivas de inducción de hipertermia localizada.

La asociación de TTFIELDS con técnicas no invasivas de inducción de hipertermia localizada se ha convertido en un enfoque prometedor para el tratamiento del cáncer. Ambas terapias se basan en el uso de campos electromagnéticos de baja intensidad, lo que las hace seguras y no invasivas para el paciente. La hipertermia localizada, en particular, ha demostrado ser efectiva en la destrucción de células cancerosas, ya que la temperatura elevada causa daño celular y muerte en las células cancerosas. [88]

La combinación de TTFIELDS con hipertermia localizada se ha estudiado en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, el glioblastoma multiforme y el cáncer de páncreas. Los estudios han demostrado que la combinación de ambas terapias puede aumentar la eficacia del tratamiento y mejorar la respuesta del paciente. Por ejemplo, un estudio en pacientes con cáncer de mama metastásico demostró que la combinación de TTFIELDS con hipertermia localizada aumentó significativamente la tasa de respuesta objetiva y prolongó la supervivencia libre de progresión en comparación con la monoterapia con TTFIELDS. [89]

La combinación de TTFIELDS con hipertermia localizada también puede tener un impacto en la resistencia a la quimioterapia y la radioterapia. [90] Se ha demostrado que la hipertermia localizada puede aumentar la eficacia de la quimioterapia y la radioterapia al mejorar la perfusión sanguínea en el área tratada, lo que aumenta la entrega de fármacos y radiación a las células cancerosas. La combinación de TTFIELDS con hipertermia localizada puede, por lo tanto, mejorar aún más la eficacia de estos tratamientos. [91]

La combinación de TTFIELDS con técnicas no invasivas de inducción de hipertermia localizada se presenta como una estrategia prometedora en el tratamiento del cáncer. Los estudios hasta la fecha han demostrado que la combinación puede mejorar significativamente la eficacia del tratamiento, la respuesta del paciente y la supervivencia en pacientes con

diferentes tipos de cáncer. A medida que se continúe investigando en esta área, se espera que la combinación de ambas terapias se convierta en una opción cada vez más importante en el tratamiento del cáncer. [92]

La combinación de TTFields con técnicas no invasivas de inducción de hipertermia localizada también ha sido objeto de estudio. Por ejemplo, se ha demostrado que la combinación de TTFields con la técnica de hipertermia magnética puede mejorar la eficacia de la terapia en el tratamiento de tumores cerebrales [93]. La hipertermia magnética utiliza partículas magnéticas que se inyectan en el tumor y se calientan mediante la exposición a un campo magnético externo, lo que produce una hipertermia localizada en el tumor.

Otra técnica no invasiva que se ha combinado con TTFields es la terapia fototérmica, que utiliza nanopartículas de oro que se dirigen al tumor y se calientan mediante la exposición a la luz láser, lo que produce una hipertermia localizada en el tumor. Esta combinación ha mostrado eficacia en el tratamiento de tumores de piel y cerebrales [94] .

En conclusión, la combinación de TTFields con técnicas no invasivas de inducción de hipertermia localizada como la hipertermia magnética y la terapia fototérmica, son opciones prometedoras en el tratamiento del cáncer. Estas terapias combinadas pueden mejorar la eficacia del tratamiento, reducir los efectos secundarios y mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

Los efectos biológicos de los campos electromagnéticos no ionizantes (EMFs) han sido investigados ampliamente durante décadas [95]. Según las directrices de la Comisión Internacional sobre Protección contra las Radiaciones No Ionizantes, "Campos Electromagnéticos de Radiofrecuencia" (RF EMFs) es el término utilizado para describir la parte del espectro electromagnético que comprende el rango de frecuencias desde 100 kHz hasta 300 GHz (www.icnirp.org). Los campos eléctricos resultan de diferencias de voltaje, mientras que los campos magnéticos resultan del flujo de corriente eléctrica. Los campos de tratamiento de tumores (TTFs) son una terapia contra el cáncer que utiliza campos eléctricos alternantes de frecuencia intermedia (aproximadamente 100-500 kHz) e intensidad baja (1-3 V/cm) para interrumpir la división celular y promover la inhibición del crecimiento del cáncer [96]. El uso de este rango de frecuencia intermedia se basa en evidencias que muestran que los campos eléctricos de baja frecuencia (<1 kHz) interrumpen progresivamente la polarización de la membrana celular, mientras que los campos de alta frecuencia (>1000 kHz) causan daños por calentamiento debido a la vibración de las moléculas celulares cargadas/polarizadas [97,98]. La técnica establecida para la aplicación de los TTFs requiere la colocación de electrodos en la superficie corporal alrededor del foco de crecimiento del tumor, de manera que se pueda generar una diferencia de potencial a través del cáncer en crecimiento (Arvind 2021, www.novocure.com) [99]. Las moléculas cargadas, si se someten a un campo eléctrico o electromagnético, son afectadas por la dirección e intensidad del flujo de energía. Sin embargo, hay diferencias clave en la forma en que los campos eléctricos y magnéticos interactúan con las moléculas cargadas, es decir (pero no limitado a): a) las líneas de campo eléctrico van en la dirección del gradiente de voltaje y no forman un bucle, mientras que las líneas de campo magnético están alrededor de las corrientes formando un bucle cerrado; b) el campo eléctrico es inversamente proporcional al gradiente de voltaje, mientras que la intensidad del campo magnético depende del número de líneas de campo producido por el imán y la corriente incluida en su bucle; c) las líneas de campo eléctrico se miden en dos dimensiones, mientras que las líneas de campo magnético se miden en tres dimensiones (<https://www.niehs.nih.gov>).

Actualmente, las aplicaciones potenciales de los campos electromagnéticos no térmicos en la terapia contra el cáncer aún no han sido implementadas [100].

La vibración molecular aumenta con el aumento de la temperatura y la hipertermia (HT) puede dañar y matar células cancerosas. Sin embargo, en la práctica, las aplicaciones basadas en HT en la oncoterapia todavía enfrentan fuertes limitaciones [101]. De acuerdo con las pautas del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, la HT es un tipo de tratamiento en el que se calienta el tejido del cuerpo hasta una temperatura tan alta como de 45°C para ayudar a dañar y matar células cancerosas con poco o ningún daño al tejido normal (www.cancer.gov). Con este fin, las técnicas sugeridas incluyen sondas que generan energía de microondas, ondas de radio, láseres, ultrasonidos, perfusión de fluidos de calefacción o calefacción de todo el cuerpo en una cámara caliente o agua caliente (www.cancer.gov). Todos estos enfoques tienen efectos secundarios potenciales y una eficacia limitada [102].

Aunque las energías electromagnéticas y térmicas pueden afectar muchas funciones celulares (por ejemplo, Silva 2020) [103], su asociación todavía está poco desarrollada como una posible onco terapia. Se ha investigado el HT basado en nanopartículas magnéticas (usadas como nano-calentadores activados por un campo magnético externo). Sin embargo, el desarrollo de eficientes nano mediadores térmicos con un alto valor de tasa de absorción específica es esencial para superar algunas limitaciones clave [es decir, no especificidad, biodisponibilidad y toxicidad] [104]. Hasta ahora, estas restricciones han impedido que el HT basado en nanopartículas alcance la práctica clínica.

En el presente informe, demostramos que los campos electromagnéticos de baja frecuencia y la hipertermia (sin el uso de nano mediadores) pueden actuar de manera sinérgica para dañar diferentes células cancerosas. Para ello, nuestro montaje experimental tuvo que cumplir dos principios: a) la mayor intensidad de campo magnético que no cause un aumento medible de la temperatura en un ambiente termorregulado a 37°C (la temperatura

interna en mamíferos), y b) la hipertermia debía aplicarse durante 4 períodos específicos de tiempo (lo cual puede lograrse in vivo y localmente por medio, por ejemplo, de ultra-sonidos de alta intensidad enfocados, HIFU). Nuestros resultados sugieren que este enfoque puede ayudar a superar las limitaciones para el uso de la hipertermia en la onco terapia.

HazMIT Trabajo

2. Objetivos

1. Estudio del efecto de las radiaciones electromagnéticas aplicados externamente y la inducción de calor por radiaciones no ionizantes afecta a la viabilidad de células tumorales.

1.1 Estudio de radiaciones electromagnéticas e hipertermia en el descenso de la viabilidad de células tumorales.

1.2 Estudio de como las radiaciones electromagnéticas e hipertermia aumentan la generación de radicales libres de oxígeno y desencadena las señales de muerte celular por la mitocondria.

1.3 Investigar como las radiaciones electromagnéticas y la hipertermia aumentan la permeabilidad lisosomal.

3. Materiales y Métodos

3.1 Cultivo de células

Las células humanas A2058 (melanoma), AsPC1 (adenocarcinoma pancreático) y MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama independiente de hormonas) fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células se cultivaron en DMEM (Invitrogen, Waltham, MA), pH 7.4, con suplementación de 10% de suero fetal de ternero desactivado por calor (FCS) (Biochrom AG, Berlín, Alemania), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Se sembraron las células (20,000 células/cm²) y se cultivaron a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂. Las células se cosecharon mediante incubación durante 5 min con 0.05% (p/v) de tripsina (Merck, Darmstadt, Alemania) en solución salina tamponada con fosfato, pH 7.4, conteniendo 0.3 mM de EDTA, seguido de la adición de 10% de FCS para inactivar la tripsina. Se determinó el número y viabilidad de las células con un Contador de Células Automatizado TC20 de BioRad (Hércules, CA). La integridad celular también se confirmó midiendo la actividad de la deshidrogenasa láctica liberada. Se permitió que las células se adhiriesen durante 24 horas antes de agregar cualquier tratamiento.

3.2 Configuración experimental para el tratamiento combinado con EMF y HT in vitro

La fuente de EMF se generó con un generador Promax-GFG-8216 (GW Instek, Taipei, Taiwan), ajustado para una señal de salida de f (frecuencia) = 100-500 KHz, con una amplitud de 2V. Este señal se puede visualizar con un osciloscopio para comprobar la precisión de la amplitud y f de la señal sinusoidal. La salida del generador se conectó con un conector BCN a un cable coaxial de 50 Ω de impedancia característica, el extremo se soldó a una bobina WE-760308102142 de Würth Elektronik (Rot am See, Alemania). Según la información del

fabricante, la bobina tiene una inductancia $L = 5,8 \mu\text{H}$ y una resistencia DC (o resistencia óhmica de un conductor) de $0,01 \Omega$. La resistencia de la piel calculada a, por ejemplo, 100 KHz es de $0,014 \Omega$. La bobina consta de dos devanados superpuestos, con dos hilos de cobre paralelos formando una espiral plana de 5 devanados. La corriente se puede calcular fácilmente en base a la tensión de salida del generador y la impedancia de la bobina obtenida del fabricante, y el campo magnético se puede calcular con esta corriente y su distribución geométrica. La bobina WE-760308102142 se modela matemáticamente como dos conjuntos de 10 vueltas concéntricas de radio creciente, un conjunto encima del otro. El diámetro exterior de las bobinas era de $48,85 \text{ mm}$, y el hilo de cobre tenía un diámetro de $1,5 \text{ mm}$. El campo de inductancia magnética B (Tesla) a lo largo del eje se calcula de la siguiente manera:

$$B = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \left[\sum_{s=1}^{K=1} \frac{(\alpha_s^K + \alpha_s^I) z_{1s}}{\alpha_s^K} + \sum_{s=1}^{K=0} \frac{(\alpha_s^K + \alpha_s^S) z_{2s}}{\alpha_s^K} \right]$$

Donde:

$$I = \frac{V}{\sqrt{R^2 + (L\omega - 1/C\omega)^2}}$$

μ_0 . Permeabilidad del espacio libre (vacío) 1.257×10^{-6} (Henry/m).

z_1 . Altura sobre la primera capa de vueltas de la bobina (mm).

$z_2 = z_1 + 0.75 \text{ mm}$.

$n = 10$. Número de vueltas de cada capa de la bobina.

ak. Radio de cada bucle (mm).

R. Resistencia (Ohm).

V. Tensión de salida del generador (Voltios).

ω (frecuencia angular) = $2\pi f$, siendo f la frecuencia (Hertz).

L. Inductancia de la bobina (Henry).

C. Capacitancia parasitaria de la bobina (Faradios).

3.3 La ecuación matemática permite calcular la inducción magnética B-campo (Tesla) a lo largo del eje de la bobina a 3mm de su superficie (aprox. 25 μ T).

Las frascos de cultivo (T25) se colocaron justo encima de la bobina, de manera que la distancia entre la base del frasco y la bobina era aproximadamente de 3mm. La bobina y el frasco se envuelven en una bolsa de plástico, que a su vez se sumerge en un baño de agua termorregulado. La temperatura del medio de cultivo se controla mediante una sonda térmica (IKA® ETS-D5 controlador de temperatura, Merck) colocada a través del tapón roscado del frasco. Bajo estas condiciones experimentales, el agua termorregulada que fluye alrededor del frasco de cultivo mantuvo la temperatura del medio de cultivo dentro del valor determinado para cada condición experimental.

3.4 Análisis de flujo citométrico y muerte celular

El ciclo celular, viabilidad y muerte fueron analizados con un BD FACSVERGE (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La muerte celular se midió utilizando yodo propidio y

Annexina V-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante.

También se distinguió la muerte celular apoptótica y necrótica mediante microscopía de fluorescencia [105]. Para ello, se incubaron las células durante 3 minutos con Hoescht 33342 (10 mM, que tiñe todos los núcleos) y yoduro de propidio (10 mM, que tiñe los núcleos de las células con una membrana plasmática alterada), y luego se analizaron con un microscopio de fluorescencia Diaphot 300 (Nikon, Tokio, Japón) con excitación a 360 nm. Los núcleos de células viables, necróticas y apoptóticas se detectaron como núcleos redondos azules, núcleos redondos rosados y núcleos fragmentados azules o rosados, respectivamente. Se contaron aproximadamente 1.500 células cada vez. Las roturas de las cadenas de ADN en las células apoptóticas se evaluaron mediante la técnica de marcado TUNEL directa (Merck) y microscopía de fluorescencia siguiendo la metodología del fabricante.

3.5 Citocromo c, factor inductor de apoptosis y proteínas de choque térmico.

Las células cancerosas fueron lavadas dos veces con solución salina tamponada de fosfato, y el sedimento fue suspendido en un buffer de homogeneización a temperatura fría (2 x 10⁶ células por ml de buffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 250 mM sacarosa, 1 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM ditionitrotol, 0.1 mM fenilmetilsulfonyl fluoride y 10 mg leupeptina, aprotinina y pepstatin A/ml). Las células fueron homogeneizadas con un homogeneizador Dounce. Después de centrifugar a 2.500 x g por 5 min a 4°C, se centrifugaron los sobrenadantes a 100.000 x g por 30 min a 4°C. El sobrenadante resultante se usó como la fracción citosólica soluble (SCF). Las proteínas se cuantificaron [106], separaron por SDS-PAGE, transferieron a membranas de nitrocelulosa y sondearon con anticuerpos monoclonales contra citocromo c (Cyt C) (ab110325, abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-AIF (sc-55519, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-heat-shock protein (Hsp) 70 (ab194360, abcam) y anti-Hsp110 (ab108625, abcam). Las láminas se

desarrollaron utilizando una anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rabano y quimioluminiscencia mejorada (sistema ECL; GE HealthCare Life Sciences, Marlborough, MA). Las bandas de proteínas se cuantificaron utilizando un Sistema de Imagen Gel Doc Go de Bio-Rad.

3.6 Potencial de la membrana mitocondrial

Se realizó la determinación cuantitativa del potencial de la membrana mitocondrial (MMP) por la captación del cation lipofílico radiomarcado methyl triphenylphosphonium (TPMP), lo que permite determinar pequeños cambios en el potencial [107]. Brevemente, las células cancerosas (2×10^6) se incubaron a 37°C durante 60 min en 1 ml de DMEM, complementado como se mencionó anteriormente pero incluyendo 1 mM de TPMP, 250 nCi [3H]TPMP (Amersham, Reino Unido) y 1 mM de tetrafenilborato de sodio.

Después de la incubación, se centrifugaron las células (1.000 x g por 5 min), se eliminaron 100 ml del sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 100 ml de 10% de Triton X-100 y se midió la radioactividad (disintegraciones/min) utilizando un Contador de Centelleo Líquido Tri-Carb de Perkin-Elmer (Waltham, MA). Se corrigió la unión no específica de TPMP como se describió previamente [13]. La captación dependiente de energización de TPMP se expresó como una relación de acumulación en unidades de [(TPMP/mg de proteína)/(TPMP/ml de sobrenadante)] [108].

3.7 Consumo de oxígeno

La concentración y el consumo de O₂ en células cancerosas aisladas se midieron usando un oxygraf de OROBOROS Instruments (Innsbruck, Austria) y como se describió previamente [109].

3.8 Generación de H₂O₂ y O₂.-

La medición cuantitativa de la generación de H₂O₂ y O₂.- siguió una metodología previamente descrita [109].

3.9 Compartimentación de células cancerosas

Los compartimentos citosólico (cyt) y mitocondrial (mt) se separaron rápidamente, como se informó previamente en detalle para células cancerosas [110], usando digitonina y centrifugación a través de una capa de aceite de silicona.

3.10 ATP

Se midieron los niveles de ATP mediante métodos enzimáticos fluorimétricos [111].

3.11 Glutación

La glutación (GSH) se determinó por LC/MS según lo reportado previamente [112]. El procesamiento celular se realizó de acuerdo con la metodología publicada, donde se utilizó la derivación rápida con N-etilmaleimida para prevenir la auto-oxidación de GSH [113].

3.12 Caspasa 3

Esta actividad se midió mediante el uso de un sustrato colorimétrico altamente sensible, N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA) siguiendo las instrucciones del fabricante (CalBiochem, La Jolla, CA). Brevemente, las células cancerosas se lisaron en un buffer de lisis [50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.1% (v/v) CHAPS, 1 mM dithiothreitol

y 0.1 mM EDTA] en hielo durante 10 min, luego se centrifugaron a 10,000 x g durante 10 min a 4°C.

Se agregaron volúmenes iguales de sobrenadantes a volúmenes iguales de buffer de ensayo [50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.1% (v/v) CHAPS, 10 mM dithiothreitol, 0.1 mM EDTA y 10% glicerol] e incubaron a 37°C durante 10 min. Luego, se agregó fresca y recién preparada Ac-DEVD-pNA (200 mM) a la mezcla y se monitoreó A405 cada 20 min durante 3 horas a temperatura ambiente. Se usaron cultivos sin lisados celulares como controles. La actividad de la enzima se calculó utilizando las fórmulas del fabricante, en pmol/min.

Se utilizó Z-DEVD-FMK (Z-Asp-Glu-Val-Asp-fluoromethylcetona; CalBiochem), disuelta en DMSO y agregada en un volumen del 0,2% para dar la concentración indicada en la sección de Resultados, como un inhibidor irreversible de la caspasa 3.

3.13 Integridad de la membrana lisosómica

Usamos LysoTracker™ Deep Red (Thermo Fisher Scientific), un tinte fluorescente rojo intenso para etiquetar y seguir los orgánulos ácidos en células vivas. La microscopía de fluorescencia se realizó a 577/590 nm (excitación/emisión). Se siguió todo el procedimiento según las recomendaciones del fabricante.

3.14 Actividades de las cathepsinas

Las líneas celulares de cáncer se sembraron en frascos T25 y, 24 horas después, se trataron como se indica en la sección de resultados. Después de la remoción del medio, se utilizó un buffer de extracción que contenía diferentes concentraciones de digitonina (Merck) para separar las cathepsinas citosólicas y totales. Cuando fuera necesario, se optimizó la concentración de digitonina para diferentes tipos de células. Las células se incubaron con un buffer de lisis frío (CellLytic™ MT Reactivo de Lisis/Extracción de Tejido Mamífero) que

contenía una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Merck) durante 15 minutos a 4°C en una plataforma oscilante. Las actividades de las cathepsinas cisteína (Cys) y aspartato (Asp) se midieron usando los sustratos fluorescentes zFR-AFC (AFC = 7-Amino-4-trifluorometilcoumarina) (excitación a 405 nm; emisión a 510 nm) y MCA-GKPILFFRLK (Dnp)-DR-NH₂ [MCA = (7-metoxicoumarina-4-il)acetilo; Dnp = dinitrofenil] (excitación a 320 nm; emisión a 420 nm) (Enzo Biochem, Nueva York, NY), respectivamente. Se usó Pepstatin A (5 mg/ml) y Leupeptin (50 mg/ml) (Merck) para inhibir la actividad de las peptidasas aspárticas y las proteasas serina-cisteína, respectivamente.

3.15 Silenciamiento génico

Se obtuvo y se transfectó un ARN pequeño de cabello específico de Hsp70 humana (shRNA) siguiendo la metodología descrita por Zhu et al. para las células de carcinoma hepatocelular HepG2 [114].

3.16 Xenografts de tumores

Las células AsPC1, cultivadas y recolectadas como se explicó anteriormente, se lavaron y se re suspendieron en DMEM y se inocularon subcutáneamente en la parte lateral del cuerpo (5 x 10⁶ células/rata nu-nu, hembra, 12 semanas de edad, Charles River Laboratories). Las ratas se alimentaron con una dieta estándar (Letica, Rochester Hills, MI). Se midió el crecimiento del tumor cada 2 días con calibradores. El volumen del tumor se calculó en mm³ basado en la siguiente fórmula, volumen = 0.5a x B², donde a y b son los diámetros largo y corto, respectivamente.

3.16 Configuración experimental para el tratamiento in vivo

Nuestra configuración experimental se basó en una técnica previamente descrita por Park et al. [115]. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano, colocados y fijados en una plataforma de metacrilato, y su cuerpo se sumergió (hasta el cuello) en un baño de agua desgasificado (24 L, 40 x 30 x 20 cm) termorregulado a 37 °C. Se colocó un solenoide (similar al utilizado in vitro, ver arriba) cerca del tumor para asegurarse de que recibiera aprox. 25 μ T. El HIFU estaba compuesto por dos elementos piezoeléctricos esféricos con una frecuencia de resonancia de 1.0 MHz, 500 W de potencia acústica (rms) y un diámetro de 60 mm (Scientia BioTech, Valencia, España). Los elementos piezoeléctricos se colocaron para emitir 2 haces ultrasonidos que impactaran el tumor, uno vertical al tumor y el otro perpendicular al anterior.

Este arreglo se diseñó de manera que la energía disipada fuera lo menos dañina posible para los tejidos no cancerosos. En el centro de uno de los elementos piezoeléctricos, se utilizó un escáner de ultrasonido como guía para monitorear la imagen del tumor. Este sistema permite una reconstrucción en 3D del tejido para la planificación y una imagen en 2D para el monitoreo durante el tratamiento. El sistema se ajustó de manera que los dos haces ultrasonidos emitidos por los elementos piezoeléctricos impactaran aproximadamente en el centro del tumor. Durante el tratamiento con radiaciones no ionizantes, no se observó ningún movimiento noticeable en las imágenes de ultrasonido en tiempo real del tumor. Los ratones fueron tratados una vez al día durante tres días consecutivos. En cada sesión, los ratones fueron sometidos durante 40 min a los efectos combinados de las EMFs y el HT inducido por el HIFU. La energía total generada por los dos transductores HIFU en el tumor fue la correspondiente a una potencia de aprox. 60 W/cm². Para asegurarse de que bajo nuestras condiciones experimentales, se alcanzaba una temperatura de aprox. 52°C dentro del tumor, en experimentos control previos se insertó un termopar (TE connectivity, Schaffhausen, Suiza) en diferentes tumores AsPC1 en vivo. Entonces, los tumores fueron sometidos a la radiación de HIFU para asegurarse de qué potencia era necesaria para alcanzar la temperatura requerida. El objetivo de este protocolo era maximizar el efecto

anticancerígeno tanto como fuera posible, pero teniendo en cuenta las limitaciones del modelo in vivo. Antes de cada sesión en la bañera, los ratones fueron pretratados durante 12 horas con campos electromagnéticos en jaulas de alojamiento para animales. Estas jaulas estaban rodeadas de una red de cables de cobre adjuntos que permitían a los ratones que portaban tumores recibir constantemente aproximadamente 25 μ T. El objetivo de este procedimiento era intentar maximizar el efecto de los campos electromagnéticos en el tumor en crecimiento. La gemcitabina (50 mg/kg) se administró 1 hora antes de cada período de tratamiento de 3 días (ver la sección de Resultados).

3.18 Declaración ética

Todos los experimentos que involucraban animales cumplieron con las leyes e políticas internacionales (Directiva CEE 86/609, BOE L 358.1, 12 de diciembre de 1987; y Guía del NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio, NIH Publ. No. 85-23, 1985) y fueron aprobados por el comité ético en experimentación animal de la Universidad de Valencia, España (ref. n.º A1454405530866).

HazMITtrabajo

4. Análisis estadístico

Los datos se presentan como valores medios \pm SD para el número de experimentos diferentes. Se realizaron análisis estadísticos utilizando la prueba t de Student, y se consideró significativo cuando $p < 0,05$.

5. Resultados: Modelos de GBM, melanoma y cáncer de páncreas humano

Los campos electromagnéticos y la hipertermia disminuyen la viabilidad de las células cancerosas.

Como se explica en la Introducción y basado en la configuración experimental (ver bajo Materiales y Métodos), la exposición a los campos electromagnéticos no se asoció con un aumento de la temperatura de la cultura celular por encima de 37 °C. Por otro lado, el protocolo para generar hipertermia en condiciones in vitro se diseñó pensando en su potencial aplicación in vivo. Un enfoque eventual in vivo para aumentar la temperatura del tumor debería ser a) rápido y específicamente enfocado en el tumor, y b) en una escala de temperatura que debería causar daños limitados a los tejidos normales cerca del tumor. Con este fin, sometimos a las células cancerosas a un rango de temperatura desde 37 °C hasta un máximo de 52 °C. Este rango de temperatura es fácil de alcanzar con diferentes metodologías, y (si se enfoca correctamente en el tumor) debería causar efectos secundarios limitados en los tejidos peritumorales normales. Como demostración de concepto, inoculamos células cancerosas AsPC1 subcutáneamente en ratones inmunodeficientes desnudos ($n = 5$) [116]. Dos semanas después de la inoculación, el volumen del tumor alcanzó 75-100 mm, y se calentó in vivo durante 20 o 40 min con un dispositivo experimental de HIFU que llevaba un solo transductor (Holosonic S.L., Valencia, España). Observamos que a) la temperatura interna del animal (controlada por una sonda térmica colocada en el recto) permaneció por debajo de 38 °C; mientras que b) la

temperatura del tumor (controlada por una sonda colocada en la piel peritumoral) pudo ser aumentada hasta 52 °C en menos de 1 min. La forma espacial del haz de HIFU era Gaussiana, proporcionando suficiente precisión en el calentamiento del tumor, por lo que solo la piel que rodeaba al tumor mostró inflamación (grado 2 después de 20 min y grado 3 después de 40 min de tratamiento con HIFU). La inflamación se puntuó de 0 a 4 de la siguiente manera: 0 (ninguna), 1 (aumento aparente de PMN en los vasos y migración de estas células hacia el tejido adyacente en la cercanía de los vasos), 2 (más difuso, pero todavía relativamente escaso), 3 (intermedio entre 2 y 4) y 4 (máxima densidad de PMN). Una vez se detuvo la energía de HIFU, la temperatura del tumor volvió a 37°C en menos de 2 minutos, una disminución de temperatura favorecida por los bien conocidos mecanismos de pérdida de calor fisiológicos. Este experimento in vivo preliminar confirmó que el HT focalizado (incluso hasta 52°C) es viable y puede tener efectos secundarios limitados.

Como se muestra en la Figura 1A, en condiciones in vitro, los campos electromagnéticos (100-200 kHz x 4h) afectan ligeramente la viabilidad de tres líneas celulares diferentes de cáncer. El HT hasta 52°C x 40 min causó una disminución significativa (aunque limitada) en la viabilidad (alrededor del 72% en células A2058, 77% en AsPC1 y 46% en células MDA-MB-231 de los valores de control) (Figura 1B). Sin embargo, como se muestra en la Figura 1C, la combinación de campos electromagnéticos y HT causó una disminución mucho mayor en la viabilidad celular (alrededor del 16%, 50% y 21% de los valores de control en las células A2058, AsPC1 y MDA-MB-231, respectivamente) después del protocolo de 4 horas descrito en la leyenda de la Figura 1. Importante, en el período de 24 horas siguiente, la población celular del tumor no recuperó su viabilidad y disminuyó a alrededor del 2,1% (A2058), 3,8% (AsPC1) y 1,6% (MDA-MB-231) de los valores de control (Figura 1C). Esto indica que el daño causado por la combinación de radiaciones no ionizantes (NIR) es grave. Sin embargo, esta disminución drástica en la viabilidad celular podría ser engañosa, ya que las células cancerosas, en condiciones in vivo, pueden implementar mecanismos para resistir el efecto de las NIR, adaptarse, sobrevivir y crecer de nuevo. Además, in vivo, las complejas

estructuras que rodean el tumor (estroma, vasculatura y otras células), más los factores paracrinos y sistémicos, pueden favorecer su supervivencia. Sabemos que incluso un pequeño% de un tumor sobreviviente puede seguir, a posteriori, un patrón de crecimiento explosivo. Por lo tanto, es clave considerar que la combinación de campos electromagnéticos y HT puede no ser suficiente y necesitar ser combinada con otras oncoterapias.

Como se muestra en la Fig. 2A, el tratamiento con EMFs y HT (protocolo de 4 horas, como en la Fig. 1C) no causó cambios significativos en la distribución del ciclo celular de las células cancerosas estudiadas. Sin embargo, es notable que la pérdida de viabilidad celular inducida por EMFs y HT está principalmente asociada a una apoptosis masiva (Fig. 2B). El efecto de EMFs o HT, ensayados por separado, no cambiaron esta tendencia, por ejemplo, en el caso de las células A2058, la pequeña disminución en la viabilidad celular inducida por EMFs o HT (Fig. 1C) también está asociada con la apoptosis (aprox. $71 \pm 7\%$ de células no viables en el caso de EMFs y $87 \pm 6\%$ en el caso de HT fueron identificados como apoptóticos, $n = 5$ en ambos casos). Las imágenes de microscopio invertido mostraron que el tratamiento con EMFs + HT causa cambios drásticos en la forma de las células cancerosas cultivadas (Fig. 3A). Es importante destacar que las células tratadas con EMFs y HT no se recuperaron en las siguientes 24 horas (Fig. 3A), sugiriendo que a) el daño causado a las células cancerosas no es reversible y b) las pocas células restantes podrían estar en una posición de debilidad particular contra el efecto citotóxico de los fármacos quimioterapéuticos. Análisis de muerte celular (Fig. 3B) y el aumento en la detección citosólica del factor inductor de apoptosis y citoquina C (Fig. 3C) confirmaron aún más la activación de la muerte celular por apoptosis inducida por EMFs y HT.

5.1 EMFs y HT aumentan la generación de ROS y la liberación de señales de muerte de las mitocondrias

Se analizó más a fondo la inducción de la muerte celular por EMFs y HT. Nos concentramos en la combinación de EMFs y HT debido a su efecto sinérgico en la viabilidad de las células cancerosas. Como se muestra en la Tabla 1, el tratamiento con EMFs y HT aumenta el consumo de O₂ y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células cancerosas. Estos efectos se asocian con una disminución en MMP, mtGSH y mtATP [todos como consecuencia del daño causado por el aumento en ROS [117]; y también con un aumento en la actividad caspasa 3 citosólica (Tabla 1), AIF y ciocromo C (Fig. 3C) [(ejecutores clave de la apoptosis [118]. Todo esto demuestra que EMFs y HT activan los mecanismos moleculares de muerte apoptótica dependiente de las mitocondrias. Se sabe que la inhibición de la producción de energía celular, la generación de ROS, el desequilibrio de la homeostasis de calcio celular o las señales de muerte celular extracelular, son todos estímulos capaces de inducir apoptosis o necrosis. La tasa relativa de estos dos procesos (activación de proteasas y endonucleasas versus catástrofe bioenergética) determina si una célula experimentará necrosis primaria o apoptosis [118], un hecho que suele reflejar la heterogeneidad de una población celular cancerosa en crecimiento. A pesar de esto, EMFs y HT causan principalmente muerte celular por apoptosis, mientras que solo un pequeño porcentaje corresponde a necrosis (Fig. 2B). A partir de aquí, queda por dilucidar si la activación de la muerte celular es una consecuencia directa de la acción de NIR en las mitocondrias o secundaria a otros mecanismo(s).

5.2 EMFs y HT aumentan la permeabilidad lisosómica

La respuesta celular al calor (HS) implica las proteínas de choque térmico (HSP). Hsp70 es el sistema HSP principal, brinda termo tolerancia y tiene un papel central en la traducción, post-traducción, prevención de agregados y refolding de proteínas agregadas [119]. Hsp110,

un cofactor de Hsp70, puede proporcionar una mayor tolerancia a la exposición celular a temperaturas extremas [120]. En las células cancerosas, Hsp70 podría ser clave, ya que está sobre-expresado en diferentes cánceres y también juega un papel anti-apoptótico favoreciendo la supervivencia de las células cancerosas (p. ej., Ciocca 2005 [121]). Como se muestra en la Fig. 4A, los niveles de Hsp70 no se ven significativamente afectados después de la exposición a EMFs y HT (protocolo de 4 horas, como en la Fig. 1C), y solo 24 horas después de la exposición, observamos en células MDA-MB-231 una disminución de aprox. 36% en comparación con los controles. Sin embargo, Hsp110 desaparece prácticamente después de la exposición a EMFs y HT, y sus niveles no se recuperan en el siguiente período de 24 horas (Fig. 4A). Estos resultados muestran, en diferentes células cancerosas, que los niveles de Hsp70 permanecen en (o cerca de) los valores de control a pesar de la exposición a EMFs y HT.

Nylandsted et al. (2004) [122] informaron que Hsp70 se encuentra en los lisosomas de las células cancerosas, pero raramente en las de las células normales, lo que facilita la supervivencia de las células cancerosas manteniendo la integridad lisosómica. Las HSP normalmente se unen a las membranas lipídicas y facilitan la estabilización de la membrana plasmática durante condiciones de estrés [123]. La permeabilización de la membrana lisosómica (LMP) se asocia con la liberación al citosol de las catepsinas cisteína y aspartato [124], que son conocidos inductores de la muerte celular apoptótica [125].

Como se muestra en la Fig. 4B, el tratamiento con EMFs y HT (protocolo de 4 horas, como en la Fig. 1C) provoca un aumento en las actividades de las catalasas citosólicas (vea también la Fig. 4C que muestra el contenido lisosómico difundiéndose en el citosol), sugiriendo que este aumento podría ser el mecanismo subyacente que activa la muerte celular apoptótica dependiente de las mitocondrias (Fig. 2B). Para probar esta hipótesis, silenciamos la expresión de Hsp70 en las células AsPC1 antes de someterlas al efecto de EMFs y HT. Usamos

estas células como prueba de concepto debido a su relativa resistencia a EMFs+HT a corto plazo (4 horas) (Fig. 1C). EMFs y HT (protocolo de 4 horas, como en la Fig. 1C), causaron una disminución en la viabilidad de las células AsPC1 salvajes a aprox. 47% de los valores de control (las células necróticas, basadas en el análisis microscópico, fueron <4% de las células no viables). El mismo estrés inducido por EMFs y HT en las células AsPC1 con knockout de Hsp70 (dependiente de shRNA) disminuyó drásticamente la viabilidad a aprox. 5% de los valores de control (% de células apoptóticas y necróticas, basadas en el análisis microscópico, fue de aprox. 27 y 73% de células no viables, respectivamente) ($p < 0,01$ comparando células AsPC1 con knockout de Hsp70 vs células salvajes AsPC1, $n = 5$). La Fig. Suplementaria S1 muestra que, en las células AsPC1 tratadas con EMFs y HT, la actividad de las catalasas citosólicas aumenta aún más en el subconjunto de células con knockout de Hsp70. El mayor % de células necróticas en las células AsPC1 con knockout de Hsp70 no es sorprendente, ya que una permeabilización masiva de la membrana lisosómica típicamente resulta en muerte celular subapoptótica o necrótica (Boya 2008) [125]. Juntos, estos datos sugieren una relación directa entre la permeabilización de la membrana lisosómica inducida por EMFs y HT, Hsp70, catalasas y la activación de la muerte celular dependiente de las mitocondrias.

5.3 Estrategias para complementar el efecto anti-cáncer de los EMF y HT y facilitar la eliminación completa de las células cancerosas

El objetivo principal de cualquier estrategia anti-cáncer es lograr la eliminación completa de todas las células cancerosas en crecimiento. Como se muestra en la Fig. 1C, en nuestras condiciones experimentales, la exposición a los EMF y HT no mata a todas las células cancerosas. La marcada resistencia de las células malignas a una temperatura tan alta como 52 °C es sorprendente. Sin embargo, como se explicó anteriormente, la viabilidad celular extremadamente baja encontrada 24 horas después del tratamiento con EMF y HT puede

ser engañosa. Por lo tanto, para hacer que nuestra estrategia sea lo más eficaz posible, investigamos primero la combinación de EMF y HT con la quimioterapia estándar actualmente en uso contra los tipos de cánceres ensayados [126-128]. Como se muestra en la Fig. 5, la combinación de EMF, HT (protocolo de 4 horas como en la Fig. 1C) y paclitaxel (PAC, en células A2058 y MDA-MB-231) o gemcitabina (GEM, en células AsPC1) disminuyó drásticamente la viabilidad celular del cáncer a aprox. 2,6% (A2058), 5,3% (AsPC1) y 1,7% (MDA-MB-231) de los valores de control. La viabilidad celular se midió nuevamente 24 horas después de la exposición a la combinación de EMF + HT + quimioterapia y no se encontró célula viable (Fig. 5). En este último período de 24 horas, se renovó el medio de cultivo para eliminar la presencia de PAC o GEM.

Ambos medicamentos se incubaron a concentraciones (1 μ M paclitaxel, 25 μ M gemcitabina) que reflejan las concentraciones biodisponibles medidas después de su administración in vivo y durante el período de tiempo utilizado en nuestros ensayos in vitro.

Ambos fármacos fueron incubados a concentraciones (1 μ M de paclitaxel, 25 μ M de gemcitabina) que reflejan las concentraciones biodisponibles medidas después de su administración in vivo y durante el período de tiempo utilizado en nuestros ensayos in vitro.

El PAC se administra a dosis de 100-250 mg/m² IV (infusión de 24 horas) (www.cancer.org). Tomando la dosis más baja de 100 mg/m², y aproximadamente 1,8 m²/70 kg en humanos, esa dosis significa aproximadamente 2,6 mg/kg x 24 horas o 0,107 mg/kg x h (0,428 mg/kg x 4 horas). El contenido de agua en el cuerpo humano es de aproximadamente 0,7 L/kg de peso corporal. Por lo tanto, un paciente recibirá aproximadamente 0,612 mg de PAC/L de agua corporal x 4 horas. Dado que 854 μ g de PAC/L son equivalentes a 1 μ M (ligeramente por encima de la concentración esperada utilizando la dosis de 100 mg/m², usamos 1 μ M

de PAC en nuestros experimentos. De hecho, los niveles de plasma de PAC libre son cercanos a 1 μM durante un período de 4-5 horas después de una dosis IV de 135 mg/m² [129].

GEM se administra generalmente en una infusión intravenosa de 1000 mg/m² durante 30 minutos una vez a la semana por 7 semanas (www.cancer.org). Esto significa 25.7 mg/Kg x 30 min o 36.7 mg de GEM/L de agua corporal x 30 min. Sin embargo, aunque 263 μg de GEM/L son equivalentes a aprox. 139 μM , las concentraciones promedio de GEM en plasma oscilan alrededor de 32 μM 30 min después de una dosis de 1000 mg/m², 8 μM a los 60 min y niveles indetectables a los 120 min [130]. Basándonos en esta farmacocinética, calculamos una concentración de 25 μM para agregar al medio de cultivo 30 min antes de terminar el período de 4 horas (como se muestra en la Figura 1C).

Basándonos en los EFMs y en el efecto de la LMP inducida por HT (ver arriba), investigamos también si las moléculas capaces de aumentar la LMP podrían mejorar el efecto antineoplásico de los EFMs y HT. Con este fin, ensayamos primero un polifenol natural, el pterostilbene (PT), que ha demostrado tener propiedades de LMP, así como otros efectos antineoplásicos [131]. Como se muestra en la Figura 6, el PT (20 μM x 4h) solo disminuyó ligeramente el número de células cancerosas viables en comparación con los valores control. La concentración de este polifenol se seleccionó basándose en criterios farmacocinéticos [132]. El PT se puede administrar in vivo en forma de sal disódica de fosfato de PT (LGC Standards, Middlesex, UK) para garantizar que la concentración seleccionada de PT pueda llegar al tumor sin efectos secundarios sistémicos durante un período equivalente a aquel utilizado en las condiciones in vitro (Estrela JM, observaciones no publicadas). Cuando se combinaron los EFMs y HT (como en la Figura 1C) con el PT, el número de células cancerosas viables disminuyó a aproximadamente 7,5% (A2058), 32,7% (AsPC1) y 6,7% (MDA-MB-231) de los valores control (Figura 6).

Además, también probamos una terapia anti-Hsp70 con apoptozole (Az, N-(4-carboxamidobenzil)-2-(3,5-bis-trifluorometil)-4,5-bis-(4-metoxifenil)-imidazol, Merck). Az es una pequeña molécula que inhibe la actividad ATPasa de Hsp70 al unirse a su dominio ATP pasa sin afectar otros Hsp, e induce la muerte celular por apoptosis del cáncer a través de la activación de caspasa [133]. Los valores IC50 de Az fueron $4,5 \pm 0,3$, $5,0 \pm 0,5$ y $4,0 \pm 0,2$ μM para las células A2058, AsPC1 y MDA-MB-231, respectivamente (n = 5 en todos los casos). Como se muestra en la Fig. 6, Az solo redujo el número de células cancerosas viables a aproximadamente 74 (A2058), 72 (AsPC1) y 60 (MDA-MB-231) % de los valores de control (Fig. 6).

Cuando se combinaron las EMFs y HT (como en la Fig. 1C) con Az, el número de células cancerosas viables disminuyó a 0 (A2058), 7,5 (AsPC1) y 0 (MDA-MB-231) % de los valores de control (Fig. 6).

5.4 La combinación de EMFs, HT y quimioterapia estándar induce la regresión de injertos de cáncer de páncreas humanos.

Como una prueba de concepto de nuestra estrategia terapéutica, investigamos si la combinación de EMFs y HT inducido por HIFU podría mejorar el efecto de la quimioterapia estándar en un carcinoma de páncreas humano que crece en ratones. Los xenotrasplantes de AsPC1 fueron tratados con gemcitabina, EMFs y HT inducido por HIFU o la combinación triple. Como se muestra en la Figura 7, la gemcitabina, administrada a un MTD [134], afectó ligeramente el crecimiento del cáncer (aprox. 22% de inhibición en comparación con los controles 35 días después de la inoculación). El efecto del tratamiento con EMFs y HIFU disminuyó el volumen del cáncer a aprox. 14% de los controles; mientras que la combinación de EMFs + HIFU + gemcitabina disminuyó el volumen del cáncer a aprox. 3-4% de los

controles 35 días después de la inoculación. Importante, en nuestras condiciones experimentales, no se observaron efectos secundarios adicionales cuando se agregaron los EMFs y HT a la quimioterapia. Estos resultados demuestran la eficacia potencial de nuestra estrategia. La drástica reducción del crecimiento del cáncer de páncreas (Fig. 7) puede facilitar su eliminación por cirugía o por tratar al animal/paciente portador del tumor con una terapia adicional enfocada (como se sugiere arriba).

HazMIT Trabajo

6. Discusión

¿Las EMFs causan calentamiento de las células? El mecanismo por el cual el campo magnético oscilante puede causar calentamiento del tejido es mediante la inducción de corrientes Foucault (o Eddy) en el tejido [135]. Estas corrientes giran alrededor de las líneas de campo magnético en el tejido y, por el efecto Joule, podrían calentar las células tumorales. Un efecto debido a la conductividad, σ , del tejido vivo. Esta conductividad proporciona la ruta para las corrientes Eddy microscópicas que fluyen en caminos circulares. La potencia por unidad de masa (P) que calienta las células se da por la siguiente ecuación: $P = \pi^2 \cdot B^2 \cdot d^2 \cdot f^2 / (6 \cdot \rho \cdot D)$. Donde B es la densidad de flujo magnético, d es la profundidad del tejido sobre la que se proporciona el campo magnético, f es la frecuencia del campo, ρ es la resistividad del tejido (inversa a la conductividad eléctrica) y D es la densidad de masa del tejido [136].

En el tejido tumoral, la conductividad puede ser hasta cinco veces mayor que la de los tejidos saludables y tiene un valor aproximado de 0,15 Siemens/m en 100-300 kHz [137]. La D para los tejidos biológicos es variable (entre 900-1050 Kg/m³), pero se puede aproximar a la del agua, 1000 Kg/m³ [138]. En nuestra configuración experimental, el valor de P es < 20 pW/Kg, lo que es muy bajo. Por lo tanto, el mecanismo relacionado con el efecto de los campos electromagnéticos no se debe al calentamiento. El efecto sinérgico con la hipertermia podría atribuirse, al menos en parte, a un aumento de la conductividad asociado con un aumento en la movilidad de las moléculas cargadas.

Los métodos de calentamiento utilizados para el tratamiento del cáncer incluyen a) calentamiento electromagnético [es decir, en orden ascendente de frecuencia y en orden descendente de penetración, capacitivo (utilizando electrodos metálicos y 8-25 MHz) o

radiofrecuencia radiativa (utilizando antenas colocadas extra corporalmente con frecuencias de operación que van desde 60 MHz hasta 150 MHz), calentamiento con microondas (400-2500 MHz), e infrarrojo (utilizando lámparas infrarrojas, frecuencia > 300 GHz) y calentamiento con láser]; b) ultrasonidos (energía acústica en frecuencias de 0.5-10 MHz); c) perfusión hipertermia, generalmente combinada con quimioterapia; d) calentamiento conductor, como implantes intersticiales de agujas metálicas con agua caliente y semillas termo-paladio-níquel; y e) nanopartículas magnéticas, expuestas a un campo magnético externo (0.1-0.2 MHz) [101]. Todos estos métodos tienen pros y contras. La HIFU se refiere a intensidades > 5W/cm², que producen efectos térmicos y mecánicos, generando un aumento de temperatura localizado en los tejidos. La administración de HIFU permite un tratamiento preciso de las áreas objetivo, donde la lesión al tejido circundante dependerá de la temperatura alcanzada y del tiempo de exposición.

En este sentido, dado que la energía ultrasónica se enfoca en un volumen específico de tejido, es clave tener en cuenta que la temperatura disminuirá (basada en un modelo gaussiano) a medida que nos alejamos de ese volumen específico. Por lo tanto, para minimizar el daño a los tejidos normales pero preservando la mayor eficacia posible, la combinación de EMF y HIFU puede ofrecer las siguientes ventajas: a) los EMF de RF no se han informado de tener alguna toxicidad significativa para los tejidos normales; b) el HIFU guiado por resonancia magnética (MRgFUS) puede dirigirse a volúmenes específicos de cánceres (tan pequeños como unos pocos mm de diámetro); c) el HIFU se puede aplicar utilizando un programa de matriz rápida (una vez que se localiza el objetivo y se reconstruye el volumen y la forma del tumor en un sistema de computadora, el programa puede diseñar la aplicación secuencial de HIFU en una serie de puntos específicos, maximizando así la eficiencia); d) trabajar con EMF y HIFU permite limitar el aumento de temperatura a un nivel que puede preservar mejor los tejidos normales circundantes; e) un diseño holográfico de las unidades transductoras piezoeléctricas de HIFU (por ejemplo, la patente WO2020/084181A1) puede reducir su número y, por lo tanto, simplificar el sistema; f) si es necesario, los EMF y HIFU se pueden aplicar varias veces (por ejemplo, una vez al día) para maximizar su eficacia in vivo. Basado en estas consideraciones técnicas, la combinación de

EMF y HIFU se puede implementar fácilmente para transferir nuestros hallazgos a aplicaciones in vivo (ver Fig. 7). (Primeras 33)

Además, tanto los campos electromagnéticos como el ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU) son técnicas no invasivas que se pueden combinar con otras terapias contra el cáncer (ver Resultados). En este sentido, la presente contribución ofrece algunas opciones efectivas. Los campos electromagnéticos y la terapia hipertermia (HT) se pueden combinar con la quimioterapia convencional (Fig. 5 y Fig. 7). Por otro lado, los campos electromagnéticos y la HT también se pueden combinar con inductores de la muerte celular lisosomal (LMP), como el PT o un fármaco específico dirigido contra Hsp70 (Fig. 6). En la actualidad, el PT se ha probado en ensayos clínicos para diferentes indicaciones, pero nunca se ha administrado por vía intravenosa a los humanos. Curiosamente, la administración oral de co-cristales de PT (como los de PT y ácido picolínico, www.circecrystal.org), que aumentan la biodisponibilidad del PT hasta 5-10 veces en comparación con el estilbeno natural solo, puede evitar la necesidad de usar la administración intravenosa. Y aun así, lograr la concentración intratumoral del polifenol necesaria para aumentar la permeabilidad lisosomal. A favor del uso terapéutico del PT está su potencial para disminuir las defensas antioxidantes dependientes de Nrf2 en las células cancerosas [116]. Por otro lado, los ensayos que involucran una terapia específica dirigida contra Hsp70 aún están en sus comienzos. Además, recientemente, algunos fármacos anticancerígenos lisosomotrópicos (por ejemplo, nortriptilina, siramesina, desipramina) y sus nano formulaciones se han diseñado para acumularse específicamente dentro de estos orgánulos. Estos fármacos pueden mejorar LMP o interrumpir la actividad de enzimas y complejos proteicos residentes, como v-ATPasa y mTORC1 [45] (se puede encontrar una lista de inductores de la muerte celular lisosomal en, por ejemplo, Domagala 2018 [46]). Mecánicamente, un aumento en la actividad de la catepsina citosólica desencadena la permeabilización de la membrana mitocondrial a través de la escisión de Bid, o a través de la activación de fosfolipasa A2 y el consiguiente aumento de ácido araquidónico [141]. Además, las

catepsinas pueden causar directamente la condensación de la cromatina [48], mientras que la acidificación del citosol también puede llevar a la activación de L-DNAasa II y la cromatinólisis [143].

Otro aspecto interesante que merece una investigación adicional es el posible papel de las HSP mitocondriales en estos mecanismos. La generación de ROS aumenta con la temperatura [144] (Tabla 1). Por lo tanto, es posible que las HSP mitocondriales (en particular Hsp70), además de sus funciones en el transporte y plegamiento de proteínas, protejan las proteínas y el ADN mitocondriales del daño térmico y de ROS.

Inicialmente, no hay razones que impidan una combinación múltiple, por ejemplo, EMFs + HT + quimioterapia + un permeabilizador lisosomal, que también es una opción factible en caso de encontrar una resistencia inesperada de las células cancerosas in vivo. En todo esto, los estudios preclínicos y los ensayos clínicos serán pasos necesarios. Naturalmente, no hay restricciones estrictas para combinar EMFs y HT con otras opciones terapéuticas específicas para ciertos tipos de cáncer disponibles (o aún en proceso de implementación), como la inmunoterapia o la terapia dirigida a señalización. También es importante tener en cuenta los posibles efectos contraproducentes de algunos estabilizadores lisosomales, como el ácido acetilsalicílico o la hidrocortisona [145]. Este tipo de medicamentos deben evitarse durante el tratamiento del cáncer con nuestra estrategia.

A pesar de las diferencias en los antecedentes genéticos y el comportamiento in vivo entre las células cancerosas, la combinación de EMFs y HT parece afectarlas de manera similar (ver p. ej., Fig. 1C) y basarse en el mismo mecanismo (ver p. ej., Tabla 1 y Fig. 4). No obstante, los niveles de Hsp70 son un claro ejemplo de un mecanismo de resistencia a la hipertermia. Hsp70 inhibe la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, reduce la

activación de caspasa y neutraliza la AIF [146]. Además, Hsp70 también se localiza en las membranas lisosomales y puede proteger la LMP inducida por diferentes estímulos [147]. Por lo tanto, aunque los posibles mecanismos de resistencia a EMFs y HT deberían ser explorados en profundidad, es alentador el hecho de que ambas energías, si se aplican en los niveles y tiempo correctos, parecen ser altamente efectivas tanto in vitro como, como se muestra en la Fig. 7, in vivo.

HazMIT Trabajo

7. Conclusión

Este trabajo demuestra que la combinación de EMFs y la hipertermia daña a diferentes células cancerosas humanas. La eficacia de este tratamiento puede mejorarse aún más utilizando inductores de LMP (como PT) o un fármaco específico dirigido contra Hsp70, y posiblemente complementar otras terapias oncológicas actuales. Esta estrategia, que puede aplicarse directamente a modelos in vivo y pacientes, puede ayudar a cambiar el sombrío resultado de diferentes tipos de cáncer con altas tasas de mortalidad.

7.1 Financiamiento.

Este trabajo fue respaldado por una subvención (SBT-002) de Scientia BioTech (Valencia, España).

7.2 Disponibilidad de materiales de datos.

Todos los datos generados durante este estudio están registrados en cuadernos de laboratorio electrónicos y están disponibles a solicitud de los autores.

7.3 Cumplimiento de los requisitos éticos.

Este estudio se realizó de acuerdo con los estándares éticos, según la Declaración de Helsinki, y de acuerdo con las pautas nacionales e internacionales. El comité de ética de la Universidad de Valencia en experimentación animal aprobó el estudio.

7.4 Declaración de intereses en conflicto.

Los autores declaran que no hay intereses en conflicto o relaciones personales que hayan influido en el trabajo informado en este artículo. R. López-Blanch, M. Oriol-Caballo y han influido en el trabajo informado en este artículo.

7.5 Apéndice A. Datos suplementarios

Los datos suplementarios para este artículo se pueden encontrar en línea en <https://doi.org/.....>

8. Referencias bibliográficas

- [1] NCI Dictionary of Cancer Terms. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms>. Accessed February 26, 2023.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [3] Gottesman MM, Lavi O, Hall MD, Gillet JP. Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2016;56:85-102. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010715-103558.
- [4] National Cancer Institute. Cancer types. <https://www.cancer.gov/types>. Accessed February 26, 2023.
- [5] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):7-33. doi:10.3322/caac.21661.
- [6] Kelloff GJ, Hoffman JM, Johnson B et al. Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2785-2808. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2626.
- [7] American Cancer Society. (2021). What Is Lung Cancer? <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/what-is.html>
- [8] National Breast Cancer Foundation. (2021). Types of Breast Cancer. <https://www.nationalbreastcancer.org/types-of-breast-cancer>

- [9] American Cancer Society. (2021). What Is Colorectal Cancer? <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/about/what-is-colorectal-cancer.html>
- [10] American Cancer Society. (2021). What Is Prostate Cancer? <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/what-is-prostate-cancer.html>
- [11] American Cancer Society. (2022). Cancer Facts & Figures 2022. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2022/cancer-facts-and-figures-2022.pdf>
- [12] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- [13] Heng, H. H., Bremer, S. W., Stevens, J. B., Ye, K. J., Liu, G., & Ye, C. J. (2006). Genetic and epigenetic heterogeneity in cancer: a genome-centric perspective. *Journal of Cellular Physiology*, 209(3), 574-586.
- [14] Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322.
- [15] Ostrand-Rosenberg, S., & Fenselau, C. (2018). Myeloid-derived suppressor cells: immune-suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment. *Journal of Immunology*, 200(2), 422-431.
- [16] Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 239-252.

- [17] Chen, F., Zhuang, X., Lin, L., Yu, P., Wang, Y., Shi, Y., ... & Wu, X. (2018). New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Medicine*, 16(1), 1-15.
- [18] Cui, Y., & Irudayaraj, J. (2017). Recent advances in cancer immunotherapy and immunology. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 45(1-6), 331-342.
- [19] Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- [20] Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), 298-307.
- [21] Patel, A. P., Tirosh, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., ... & Bernstein, B. E. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*, 344(6190), 1396-1401.
- [22] Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252-264.
- [23] Sharma, S. V., Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P., Takahashi, F., Maheswaran, S., ... & Settleman, J. (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*, 141(1), 69-80
- [24] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- [25] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*. 2002 Aug;2(1):48-58.

- [26] Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008 Oct 7;13(4):472-82.
- [27] Alfarouk KO, Bashir AHH, Aljarbou AN, Ramadan AM, Muddathir AK, AlHoufie STS, et al. Cancer and a disrupted tissue microenvironment: A critical interplay. *Current Cancer Drug Targets*. 2019;19(2):117-28.
- [28] Bozic I, Reiter JG, Allen B, Antal T, Chatterjee K, Shah P, et al. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *eLife*. 2013;2:e00747.
- [29] Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Letters*. 2015 Nov 1;356(2 Pt A):156-64.
- [30] Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2011 Aug;11(6):393-410.
- [31] Damia G, Broggin M. Platinum resistance in ovarian cancer: role of DNA repair. *Cancers*. 2019 Feb;11(2):119.
- [32] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7-34.
- [33] Porporato PE. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis*. 2016 Mar 7;5(3):e200.
- [34] Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*. 2014 Nov;14(8):535-46.

- [35] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96.
- [36] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7-34.
- [37] Porporato PE. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis*. 2016 Mar 7;5(3):e200.
- [38] Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*. 2014 Nov;14(8):535-46.
- [40] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96.
- [41] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018 Nov;68(6):394-424.
- [42] Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2006 Dec 14;355(24):2542-50.
- [48] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Jan;69(1):7-34.

- [44] Porporato PE. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis*. 2016 Mar 7;5(3):e200.
- [45] Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*. 2014 Nov;14(8):535-46.
- [46] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96.
- [47] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018 Nov;68(6):394-424.
- [48] Tabernero, J., Van Cutsem, E., Diaz-Rubio, E., et al. (2015). Aflibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and irinotecan in the treatment of previously
- [49] Salehi B, Fokou PVT, Sharifi-Rad M, et al. The therapeutic potential of apigenin. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6):1305. doi:10.3390/ijms20061305
- [50] McCormack D, McFadden D. A review of pterostilbene antioxidant activity and disease modification. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:575482. doi:10.1155/2013/575482
- [51] Li Y, Zhang T, Korkaya H, et al. Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clin Cancer Res*. 2010;16(9):2580-2590. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2937

- [52] Waddington KE, Jurcic K, Lee L, et al. Pterostilbene pre-treatment improves the efficacy of doxorubicin in a patient-derived xenograft model of triple negative breast cancer. *Front Oncol.* 2019;9:1021. doi:10.3389/fonc.2019.01021
- [53] Muruganandan S, Srinivasan K, Gupta S, Gupta PK. Anticancer activity of pterostilbene. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2017;12(1):95-103. doi:10.2174/1574892812666161116145639
- [54] Paul S, DeCastro AJ, Lee HJ, Smolarek AK, So JY, Simi B, Wang CX, Zhou R. Dietary intake of pterostilbene, a constituent of blueberries, inhibits the β -catenin/p65 downstream signaling pathway and colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* 2010 Oct;31(10):1704-11.
- [55] Siedlecka-Kroplewska K, Jozwik A, Kaszubowska L, et al. Synergistic interaction between pterostilbene and oxaliplatin as a potential therapeutic approach for ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2021 Jan 14;22(2):905.
- [56] Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004 May;79(5):727-47.
- [57] Zou T, Chen D, Yang Q, et al. Resveratrol and Pterostilbene as a MicroRNA-Mediated Therapeutic Approach for Cancer: Current Progress and Promise. *BioMed Research International.* 2019 Jul 21;2019:4245876.
- [58] Wong YT, Gruber J, Jenner AM, et al. Profiling of differentially expressed genes using suppression subtractive hybridization in an in vitro model of pterostilbene action. *J Agric Food Chem.* 2010 Jun 23;58(12):7324-31.

- [59] Chiou YS, Ma NJ, Sang S, et al. Ho CT. Pterostilbene is more potent than resveratrol in preventing azoxymethane (AOM)-induced colon tumorigenesis via activation of the NF-E2-related factor 2 (Nrf2)-mediated antioxidant signaling pathway. *J Agric Food Chem*. 2011 Mar 9;59(5):2725-33.
- [60] Bhat TA, Nambiar D, Pal A, et al. The almighty pterostilbene in cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Letters*. 2021 Jun 28:S0304-3835(21)00342-3.
- [61] Kirsch DG, Diehn M, Kesarwala AH, Maity A, Morgan MA, Schwarz JK, et al. The future of radiation oncology in the United States from 2010 to 2020: will supply keep pace with demand? *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1013-9.
- [62] Altieri S, Sartore-Bianchi A, Benvenuti S, Lupo B, Saletti P, Bidoli P, et al. Molecular pathways: recognizing and targeting resistance in molecular oncology. *Clin Cancer Res*. 2013 Sep 1;19(17):4165-73.
- [63] Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer*. 2012 Jun;48(14):2192-202.
- [64] Trusheim J, Dunbar E, Battiste J, Hompesch M, Larkins E, Ryu S, et al. A review of radiation therapy and TTFIELDS with temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *Front Oncol*. 2019 Nov 14;9:1185.
- [65] Skaga E, Kuleskiy E, Fayzullin A, Sandberg CJ, Potdar S, Kyttälä A, et al. Intertumoral heterogeneity in patient-specific drug sensitivities in treatment-naïve glioblastoma. *BMC Cancer*. 2019 Jan 8;19(1):34.

- [66] Eichler AF, Kahle KT, Wang DL, Joshi VA, Willers H, Engelman JA, et al. EGFR mutation status and survival after diagnosis of brain metastasis in nonsmall cell lung cancer. *Neuro Oncol.* 2010 Jul;12(7):1193-9.
- [67] Hickey, B. E., James, M. L., & Lehman, M. (2016). Clinical overview of radiation therapy. *Journal of Medical Radiation Sciences*, 63(1), 17-22.
- [68] Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A. A., Kesari, S., Steinberg, D. M., Toms, S. A., ... & Ram, Z. (2015). Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA*, 314(23), 2535-2543.
- [69] Allison, R. R., Sibata, C. H., & Murray, L. J. (2010). Photodynamic therapy. *Current oncology reports*, 12(3), 204-211.
- [70] Kaminski, J., Streb, J., & Hafner, J. (2014). Laser therapy in oncology. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 11(3), 342-348.
- [71] Mariotto, A. B., Yabroff, K. R., Shao, Y., Feuer, E. J., & Brown, M. L. (2011). Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010-2020. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(2), 117-128.
- [72] Wu, F., Wang, Z. B., Cao, Y. D., Chen, W. Z., Bie, X. M., & Gui, Y. (2005). A randomised clinical trial of high-intensity focused ultrasound ablation for the treatment of patients with localised breast cancer. *British Journal of Cancer*, 92(3), 477-483.
- [73] R. Issels, "Hyperthermia adds to chemotherapy," *European Journal of Cancer*, vol. 42, pp. 245-252, 2006.

- [74] J. J. D. Kim, S. W. Tae, and C. W. Kim, "Hyperthermia and radiotherapy with or without chemotherapy in locally advanced cervical cancer," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 49, pp. 1341-1348, 2001.
- [75] T. Nishimura et al., "Hyperthermia in Combination with Radiation Therapy for Recurrent or Metastatic Adenocarcinoma of the Stomach," *Oncology*, vol. 89, pp. 175-181, 2015.
- [76] K. Ueda et al., "The effect of hyperthermia on the growth of HeLa cells in vitro," *International Journal of Hyperthermia*, vol. 7, pp. 463-472, 1991.
- [77] Y. Sugimachi et al., "Hyperthermia combined with chemotherapy for the treatment of primary unresectable hepatocellular carcinoma," *Cancer*, vol. 83, pp. 1894-1900, 1998.
- [78] S. Saito et al., "Hyperthermia for metastatic liver tumors," *International Journal of Hyperthermia*, vol. 18, pp. 510-516, 2002.
- [78] Hurwitz MD, Stauffer PR. Hyperthermia, radiation and chemotherapy: the role of heat in multidisciplinary cancer care. *Semin Oncol.* 2014;41(6):714-729.
- [80] Van der Zee J, Gonzalez D, van Rhoon GC, et al. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. Dutch Deep Hyperthermia Group. *Lancet.* 2000;355(9210):1119-1125.
- [81] Gouy S, Morice P, Narducci F, et al. Prospective study of the feasibility and efficacy of radiotherapy with concomitant weekly intraperitoneal cisplatin followed

by carboplatin/paclitaxel in patients with optimally cytoreduced advanced ovarian cancer. *Ann Oncol.* 2012;23(4):1033-1039.

- [82] Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 2002;3(8):487-497.
- [83] R. De Santis, A. Santoro, E. Ancona, G. Vincenzi, G. Talamonti, and L. De Liguoro, "Hyperthermia in Oncology", in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, vol. 876, pp. 143-157.
- [84] J. E. Stauffer, "Evolution of hyperthermia in oncology," from *Thermoradiotherapy and Thermochemotherapy*, 1995, vol. 1, pp. 23-32.
- [85] A. S. Azar and P. S. Thornton, "Clinical update on hyperthermia in cancer therapy," *Cancer Journal*, 2001, vol. 7, no. 1, pp. 34-39.
- [86] Franckena M, Lutgens L, Koper P, et al. Radiotherapy and hyperthermia for treatment of primary locally advanced cervix cancer: results in 378 patients. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.* 2009;73(1):242-250. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.03.044.
- [87] Mira JG, Manso M, Simón R, Fernández JM. Hyperthermia with a 433 MHz microwave device in advanced malignant tumors: study of clinical response and survival in 98 patients. *Radiation Oncology Investigations.* 1999;7(5):327-335. doi: 10.1002/(SICI)1520-6823(1999)7:5<327.
- [88] Giladi M, Weinberg U, Schneiderman RS, Porat Y, Munster M, Voloshin T, Kirson ED, Palti Y. Alternating electric fields (TTFields) and chemotherapy for the treatment of recurrent glioblastoma: safety and efficacy. *J Cancer Res Ther.* 2011;7(3):271-6.

- [89] Szasz A, Vincze Gy, Szasz O. [Electro-hyperthermia: a new paradigm in cancer therapy]. *Magy Onkol.* 2012;56(4):264-74. Hungarian.
- [90] Szasz A, Szasz N, Szasz O. *Oncothermia - Principles and Practices.* Springer; 2011.
- [91] Burd R, Dzedzic TS. Rationale for combining external hyperthermia and TTFields in the treatment of advanced stage NSCLC. In: *Proceedings of the AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics: 2015 Nov 5-9; Boston, MA.* Philadelphia (PA): AACR; *Mol Cancer Ther* 2015;14(12 Suppl 2):Abstract nr A162.
- [92] Di Matteo F, Ricci A, Vasuri F, Gruppioni E, Pasquinelli G. The role of electromagnetic fields in neurological disorders. *J Neurol.* 2020;267(7):2026-2036.
- [93] Maier-Hauff, K., Rothe, R., Scholz, R., Gneveckow, U., Wust, P., Thiesen, B., ... & Budach, V. (2007). Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology*, 81(1), 53-60.
- [94] Van der Zee, J., González González, D., van Rhoon, G. C., van Dijk, J. D., van Putten, W. L., & Hart, A. A. (2000). Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. Dutch Deep Hyperthermia Group. *The Lancet*, 355(9210), 1119-1125.

Tesis original desde acá

- [95] Saliev T, Begimbetova D, Masoud A-R, Matkarimov B. Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin. *Prog Biophys Mol Biol* 2019;141:25–36. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.07.009>.
- [96] Wenger C, Miranda PC, Salvador R, Thielscher A, Bomzon Z, Giladi M, et al. A Review on Tumor-Treating Fields (TTFields): Clinical Implications Inferred From Computational Modeling. *IEEE Rev Biomed Eng* 2018;11:195–207. <https://doi.org/10.1109/RBME.2017.2765282>.
- [97] Chang F, Minc N. Electrochemical control of cell and tissue polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014;30:317–36. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013357>.
- [98] Krenacs T, Meggyeshazi N, Forika G, Kiss E, Hamar P, Szekely T, et al. Modulated Electro-Hyperthermia-Induced Tumor Damage Mechanisms Revealed in Cancer Models. *Int J Mol Sci* 2020;21:E6270. <https://doi.org/10.3390/ijms21176270>.
- [99] Arvind R, Chandana SR, Borad MJ, Pennington D, Mody K, Babiker H. Tumor-Treating Fields: A fourth modality in cancer treatment, new practice updates. *Crit Rev Oncol Hematol* 2021;168:103535. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103535>.
- [100] Wust P, Stein U, Ghadjar P. Non-thermal membrane effects of electromagnetic fields and therapeutic applications in oncology. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group* 2021;38:715–31. <https://doi.org/10.1080/02656736.2021.1914354>.

- [101] Kok HP, Cressman ENK, Ceelen W, Brace CL, Ivkov R, Gröll H, et al. Heating technology for malignant tumors: a review. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group* 2020;37:711–41. <https://doi.org/10.1080/02656736.2020.1779357>.
- [102] Lee S-Y, Fiorentini G, Szasz AM, Szigeti G, Szasz A, Minnaar CA. Quo Vadis Oncological Hyperthermia (2020)? *Front Oncol* 2020;10:1690. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01690>.
- [103] Silva PL, Savchuk OA, Gallo J, García-Hevia L, Bañobre-López M, Nieder JB. Mapping intracellular thermal response of cancer cells to magnetic hyperthermia treatment. *Nanoscale* 2020;12:21647–56. <https://doi.org/10.1039/c9nr10370h>.
- [104] Das P, Colombo M, Prosperi D. Recent advances in magnetic fluid hyperthermia for cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019;174:42–55. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.051>.
- [105] Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Itoh Y, Hasegawa J, Yamabe K, et al. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res* 1996;56:2161–6.

- [106] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [107] Scarlett JL, Sheard PW, Hughes G, Ledgerwood EC, Ku HH, Murphy MP. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Lett* 2000;475:267–72.
- [108] James AM, Wei YH, Pang CY, Murphy MP. Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* 1996;318 (Pt 2):401–7. <https://doi.org/10.1042/bj3180401>.
- [109] López-Blanch R, Salvador-Palmer R, Estrela JM, Obrador E. An Intercellular Flow of Glutathione Regulated by Interleukin 6 Links Astrocytes and the Liver in the Pathophysiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxid Basel Switz* 2021;10:2007. <https://doi.org/10.3390/antiox10122007>.
- [110] Obrador E, Navarro J, Mompo J, Asensi M, Pellicer JA, Estrela JM. Glutathione and the rate of cellular proliferation determine tumour cell sensitivity to tumour necrosis factor in vivo. *Biochem J* 1997;325 (Pt 1):183–9. <https://doi.org/10.1042/bj3250183>.
- [111] Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie; 1974.

- [112] Obrador E, Valles SL, Benlloch M, Sirerol JA, Pellicer JA, Alcácer J, et al. Glucocorticoid receptor knockdown decreases the antioxidant protection of B16 melanoma cells: an endocrine system-related mechanism that compromises metastatic cell resistance to vascular endothelium-induced tumor cytotoxicity. *PLoS One* 2014;9:e96466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096466>.
- [113] Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Estrela JM, Viña J. Determination of oxidized glutathione in blood: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1994;234:367–71. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)34106-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)34106-0).
- [114] Zhu Q, Xu Y-M, Wang L-F, Zhang Y, Wang F, Zhao J, et al. Heat shock protein 70 silencing enhances apoptosis inducing factor-mediated cell death in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cancer Biol Ther* 2009;8:792–8. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.9.8127>.
- [115] Park E-J, Ahn YD, Lee JY. In vivo study of enhanced chemotherapy combined with ultrasound image-guided focused ultrasound (USgFUS) treatment for pancreatic cancer in a xenograft mouse model. *Eur Radiol* 2018;28:3710–8. <https://doi.org/10.1007/s00330-018-5355-9>.
- [116] Benlloch M, Obrador E, Valles SL, Rodriguez ML, Sirerol JA, Alcácer J, et al. Pterostilbene Decreases the Antioxidant Defenses of Aggressive Cancer Cells In Vivo:

A Physiological Glucocorticoids- and Nrf2-Dependent Mechanism. *Antioxid Redox Signal* 2016;24:974–90. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6437>.

- [117] Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell* 2020;38:167–97. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>.
- [118] Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513–9. <https://doi.org/10.1038/74994>.
- [119] Lepock JR. How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group* 2005;21:681–7. <https://doi.org/10.1080/02656730500307298>.
- [120] Oh HJ, Chen X, Subjeck JR. Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *J Biol Chem* 1997;272:31636–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31636>.
- [121] Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* 2005;10:86–103. <https://doi.org/10.1379/csc-99r.1>.
- [122] Calvaresi V, Truelsen LT, Larsen SB, Petersen NHT, Kirkegaard T, Rand KD. Conformational dynamics of free and membrane-bound human Hsp70 in model

cytosolic and endo-lysosomal environments. *Commun Biol* 2021;4:1369.
<https://doi.org/10.1038/s42003-021-02892-7>.

- [123] Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 2008;27:6434–51. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.310>.
- [124] Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. *Biol Chem* 2007;388:555–60. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.064>.
- [125] Specenier P. Efficacy of nab-paclitaxel in treating metastatic melanoma. *Expert Opin Pharmacother* 2019;20:495–500. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1569628>.
- [126] Abu Samaan TM, Samec M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules* 2019;9:E789. <https://doi.org/10.3390/biom9120789>.
- [127] Sarvepalli D, Rashid MU, Rahman AU, Ullah W, Hussain I, Hasan B, et al. Gemcitabine: A Review of Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Crit Rev Oncog* 2019;24:199–212. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2019031641>.

- [128] Brouwer E, Verweij J, De Bruijn P, Loos WJ, Pillay M, Buijs D, et al. Measurement of fraction unbound paclitaxel in human plasma. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 2000;28:1141–5.
- [129] Ciccolini J, Serdjebi C, Peters GJ, Giovannetti E. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016;78:1–12. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3003-0>.
- [130] Mena S, Rodríguez ML, Ponsoda X, Estrela JM, Jäätelä M, Ortega AL. Pterostilbene-induced tumor cytotoxicity: a lysosomal membrane permeabilization-dependent mechanism. *PLoS One* 2012;7:e44524. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044524>.
- [131] Priego S, Feddi F, Ferrer P, Mena S, Benlloch M, Ortega A, et al. Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3330–42. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0363>.
- [132] Ko S-K, Kim J, Na DC, Park S, Park S-H, Hyun JY, et al. A small molecule inhibitor of ATPase activity of HSP70 induces apoptosis and has antitumor activities. *Chem Biol* 2015;22:391–403. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.02.004>.

- [133] Awasthi N, Zhang C, Schwarz AM, Hinz S, Wang C, Williams NS, et al. Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2013;34:2361–9. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt227>.
- [134] Aguiar PM, Jacquinet J-F, Sakellariou D. Experimental and numerical examination of eddy (Foucault) currents in rotating micro-coils: Generation of heat and its impact on sample temperature. *J Magn Reson San Diego Calif* 1997 2009;200:6–14. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2009.05.010>.
- [135] Peters MJ, Stinstra G, Hendriks M. Estimation of the electrical conductivity of human tissue. *Electromagnetics* 2001;21:545–57. <https://doi.org/10.1080/027263401752246199>.
- [136] Miklavčič D, Pavšelj N, Hart FX. *Electric Properties of Tissues*. Wiley Encycl. Biomed. Eng., John Wiley & Sons, Ltd; 2006. <https://doi.org/10.1002/9780471740360.ebs0403>.
- [137] Miller WH, Hartmann-Siantar C, Fisher D, Descalle M-A, Daly T, Lehmann J, et al. Evaluation of beta-absorbed fractions in a mouse model for ⁹⁰Y, ¹⁸⁸Re, ¹⁶⁶Ho, ¹⁴⁹Pm, ⁶⁴Cu, and ¹⁷⁷Lu radionuclides. *Cancer Biother Radiopharm* 2005;20:436–49. <https://doi.org/10.1089/cbr.2005.20.436>.

- [138] Allemailem KS, Almatroudi A, Alrumaihi F, Almatroodi SA, Alkurbi MO, Basfar GT, et al. Novel Approaches of Dysregulating Lysosome Functions in Cancer Cells by Specific Drugs and Its Nanoformulations: A Smart Approach of Modern Therapeutics. *Int J Nanomedicine* 2021;16:5065–98. <https://doi.org/10.2147/IJN.S321343>.
- [139] Domagala A, Fidyk K, Bobrowicz M, Stachura J, Szczygiel K, Firczuk M. Typical and Atypical Inducers of Lysosomal Cell Death: A Promising Anticancer Strategy. *Int J Mol Sci* 2018;19:E2256. <https://doi.org/10.3390/ijms19082256>.
- [140] Jäättelä M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 2004;23:2746–56. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207513>.
- [141] Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S, Shibata M, Waguri S, Sato N, et al. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience* 1999;91:233–49. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00566-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00566-1).
- [142] Barry MA, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 1993;300:440–50. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1060>.
- [143] Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group* 2014;30:513–23. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>.

- [144] Alamo C, Ferrándiz B, López-Muñoz F, Alguacil LF. Influence of butibufen on enzyme activity and lysosomal stabilization ex vivo: a comparative study with hydrocortisone and acetylsalicylic acid. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1995;17:303–10.
- [145] Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle Georget Tex* 2006;5:2592–601. <https://doi.org/10.4161/cc.5.22.3448>.
- [146] Petersen NHT, Kirkegaard T, Olsen OD, Jäättelä M. Connecting Hsp70, sphingolipid metabolism and lysosomal stability. *Cell Cycle Georget Tex* 2010;9:2305–9. <https://doi.org/10.4161/cc.9.12.12052>.
- [147] Rappa, F., Farina, F., Zummo, G., David, S., & Campanella, C. (2014). Carini, N., & Cappello, F. (2014). Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.

8. Anexos

Tabla 1.

Efecto de EMFs y HT en la generación de ROS y los mecanismos moleculares de apoptosis. Todos los parámetros se midieron en células cancerosas después de la exposición a EMFs y HT (protocolo de 4 horas como en la Fig. 1C). *p <0,05, **p <0,01 en comparación con los controles no tratados (n = 5-6).

| | A2058 | | AsPC1 | | MDA-MB-231 | |
|---|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | - | + EMFs+HT | - | + EMFs+HT | - | + EMFs+HT |
| O₂ consumption (pmol/10 ⁶ cells x min) | 627 ± 79 | 1067 ± 165** | 784 ± 102 | 1226 ± 188** | 551 ± 82 | 1046 ± 124** |
| H₂O₂ (nmol/10 ⁶ cells x min) | 0.77 ± 0.10 | 1.56 ± 0.31** | 0.94 ± 0.15 | 1.47 ± 0.27* | 0.62 ± 0.13 | 1.24 ± 0.29** |
| O₂^{-•} (nmol/10 ⁶ cells x min) | 0.33 ± 0.04 | 0.69 ± 0.12** | 0.45 ± 0.07 | 0.72 ± 0.15** | 0.26 ± 0.05 | 0.48 ± 0.09** |
| MMP (TPM accumulation ratio, %) | 100 ± 5 | 42 ± 15** | 100 ± 4 | 56 ± 16** | 100 ± 6 | 35 ± 12** |
| mtGSH (nmol/10 ⁶ cells) | 4.2 ± 0.9 | 2.0 ± 0.5** | 2.8 ± 0.6 | 1.3 ± 0.5** | 3.5 ± 0.7 | 1.5 ± 0.5** |
| mtATP (mM) | 1.05 ± 0.10 | 0.52 ± 0.14** | 0.96 ± 0.12 | 0.41 ± 0.09** | 0.92 ± 0.13 | 0.33 ± 0.08** |
| Caspase 3 (pmol/10 ⁶ cells x min) | 1.87 ± 0.46 | 3.66 ± 0.39** | 1.67 ± 0.35 | 3.15 ± 0.42** | 2.05 ± 0.51 | 4.14 ± 0.67** |

Figura 1

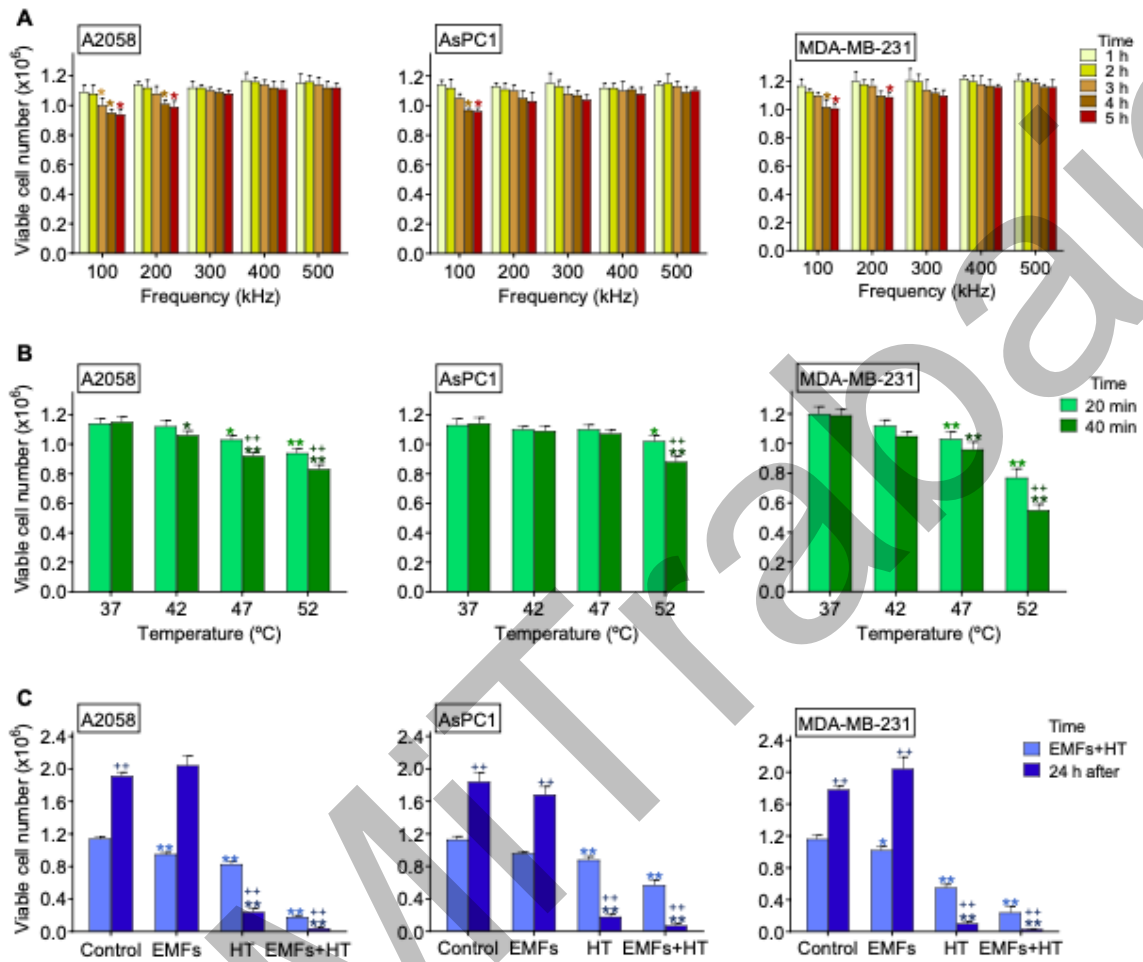
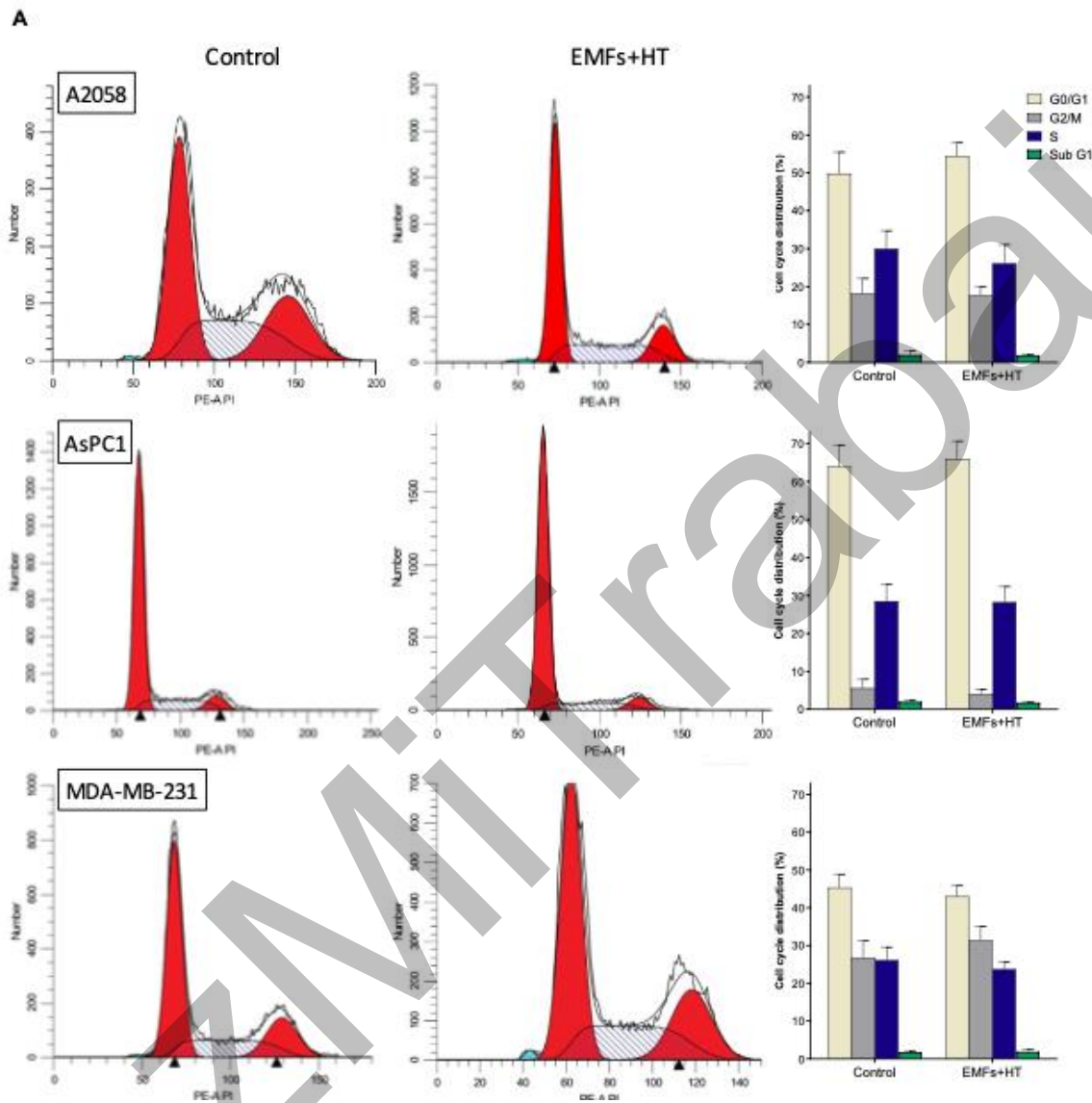


Figura 2



B

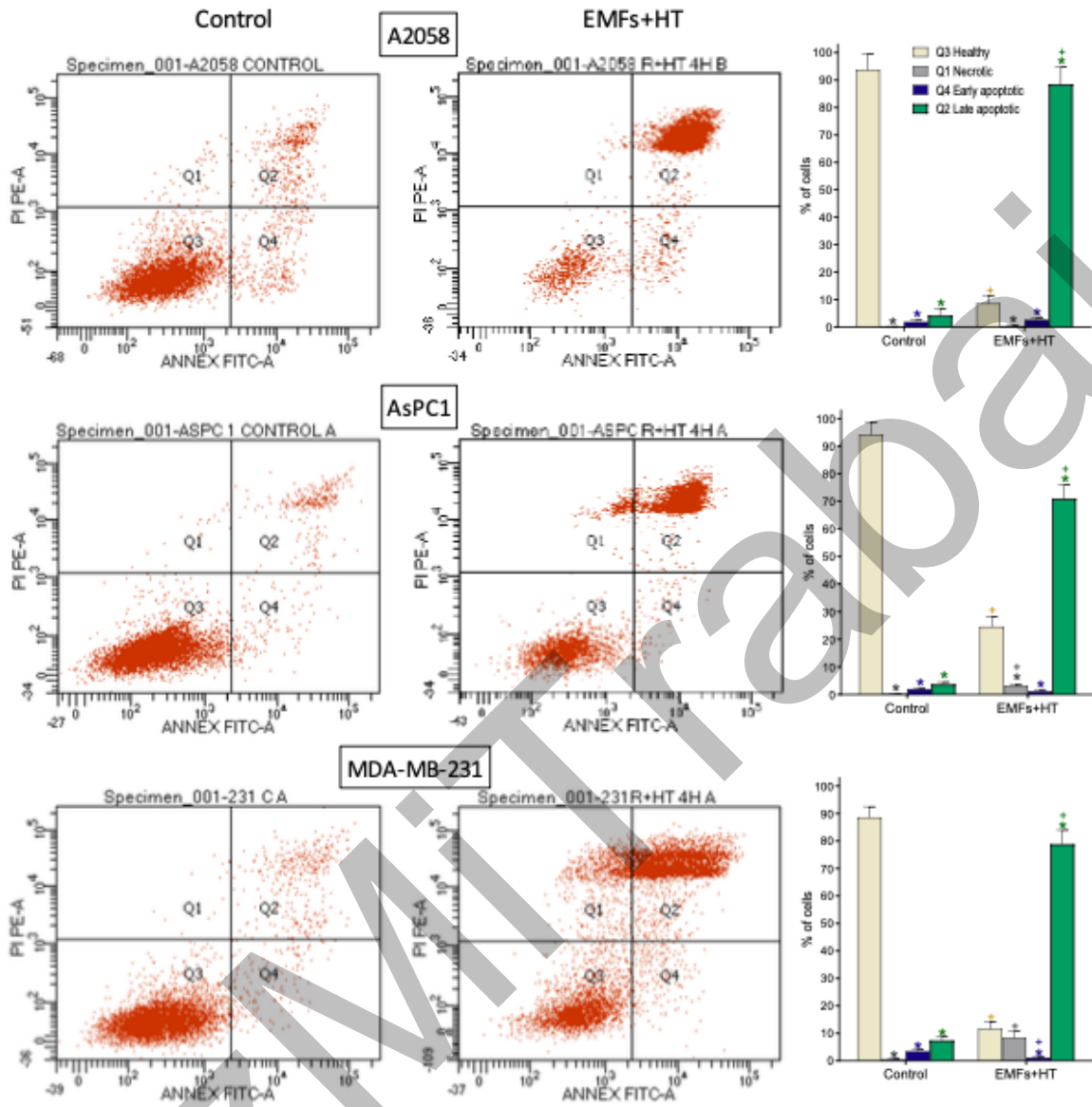


Figura 3

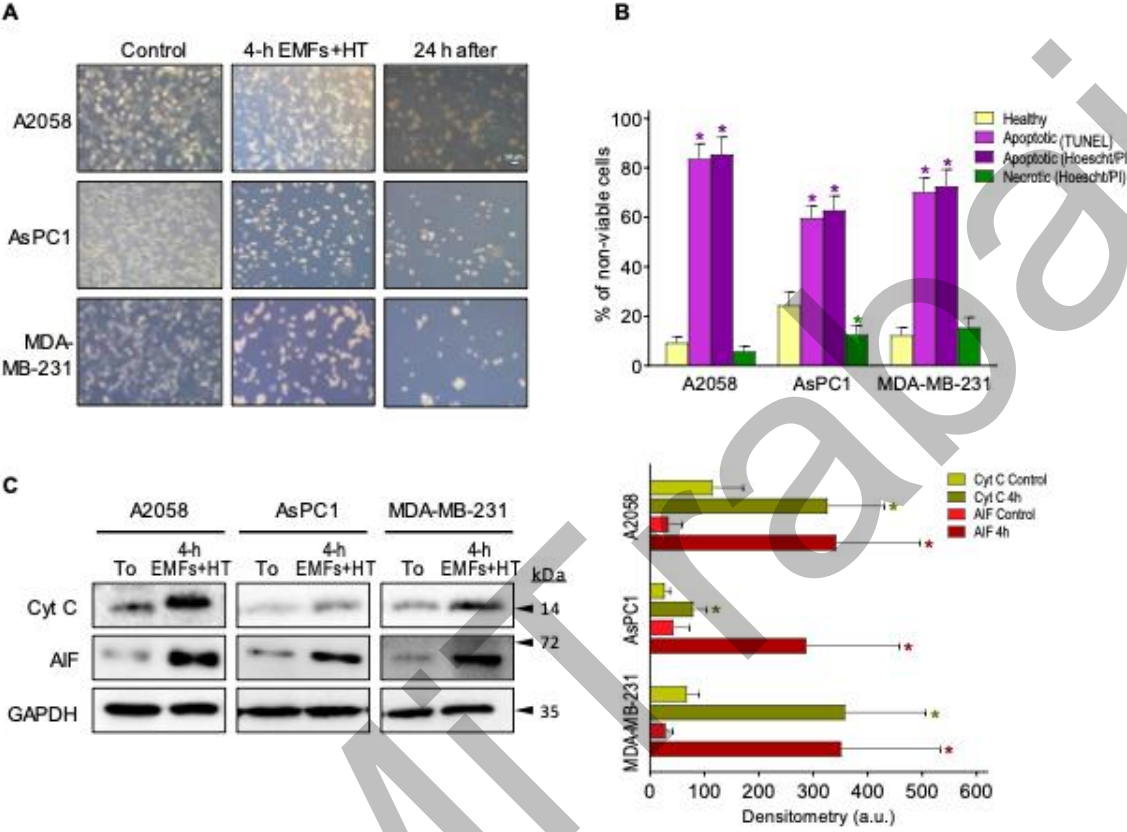


Figura 4

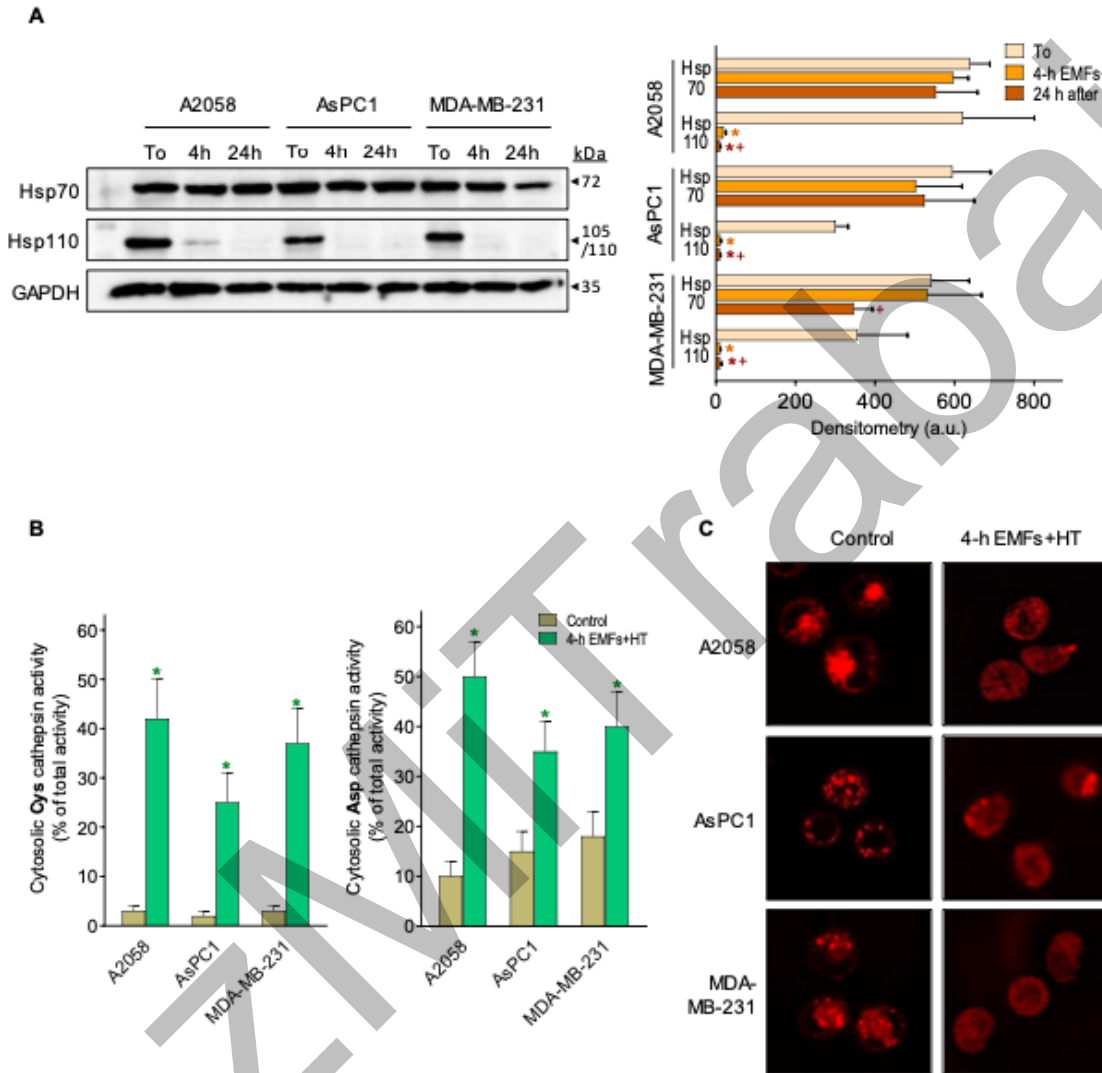


Figura 5

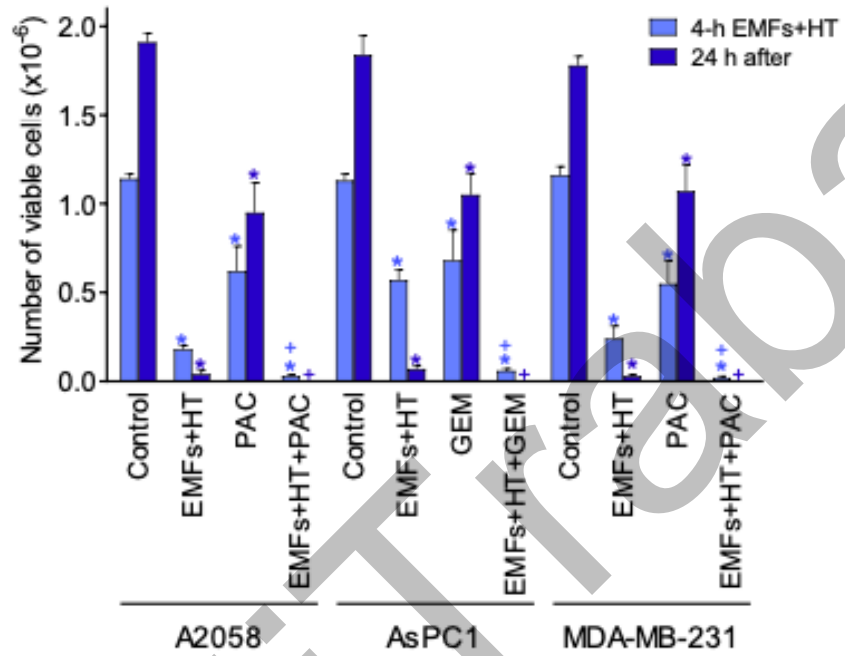
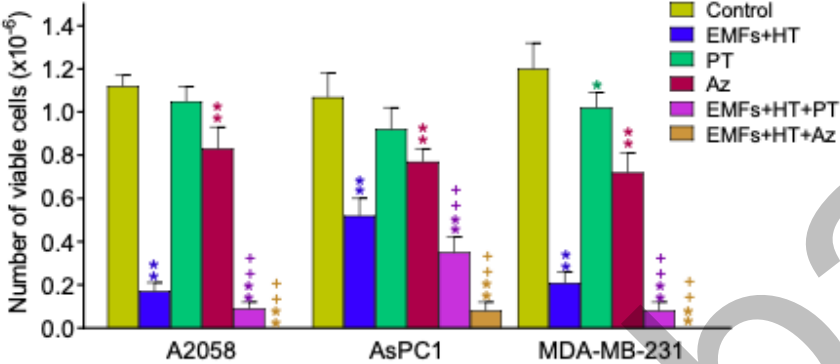


Figura 6



HazMITrapaio

8.1 Explicación de figuras

Figura 1

Fig. 1. Efecto de los EMFs y la HT sobre la viabilidad de células cancerosas. (A) Efecto de los EMFs. Las células cancerosas se sembraron y 24 horas después se expusieron a EMFs (100-500 kHz x 1-5 h). Los valores de control (0 kHz) fueron de 1.14 ± 0.03 A2058, 1.13 ± 0.04 AsPC1 y 1.20 ± 0.05 MDA-MB-231 ($\times 10^6$) células viables ($n = 5$ en todos los casos). * $p < 0.05$ comparando todas las condiciones versus los controles (0 kHz) ($n = 5$). (B) Efecto de la HT. Las células cancerosas se sembraron y 24 horas después se expusieron a HT (42-52 oC x 20-40 min). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparando todas las condiciones versus los controles (37 oC); ++ $p < 0.01$ comparando 40 min versus 20 min ($n = 5$). (C) Efecto de los EMFs y la HT. Las células cancerosas se sembraron y 24 horas después se expusieron a EMFs (100 kHz x 4h) y HT (52 oC x 40 min, desde el minuto 120 hasta el minuto 160 del período de 4 horas en el que las células estuvieron constantemente expuestas a los EMFs). Luego, las células sobrevivientes se cultivaron durante 24 horas adicionales sin más exposición a los EMFs y la HT. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparando todas las condiciones versus los controles; ++ $p < 0.01$ comparando 24h versus 4h.

Figura 2

Efecto de EMFs y HT en la distribución del ciclo celular y el tipo de muerte en células cancerosas. (A) Análisis de citometría de flujo de la distribución del ciclo celular después de la exposición a EMFs y HT como en la Fig. 1C ($n = 5$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el tratamiento con EMFs+HT y los controles. (B) Análisis de citometría de flujo de la apoptosis y necrosis inducidas por EMFs y HT (tratamiento como en la Fig. 1C). * $p < 0.01$ al comparar Q1 (células necróticas), Q2 (células apoptóticas tardías) y Q4 (células apoptóticas tempranas) versus Q3 (células saludables); y ++ $p < 0.01$ al comparar EMFs y HT versus controles sin tratar ($n = 5$).

Figura 3

Efecto de EMFs y HT en la activación de la muerte apoptótica en células cancerosas. (Imágenes de microscopio invertido (aumento x 10) de células cancerosas tratadas con EMFs y HT (como en la Fig. 1C) que muestran los drásticos cambios morfológicos asociados con la pérdida de viabilidad. (B) Análisis de muerte celular, después del protocolo de 4 h (Fig. 1C), basado en la tinción de Hoescht 33342 y yoduro de propidio (PI) y el ensayo de etiquetado TUNEL (ver en Métodos). La viabilidad celular en los matraces de control fue > 98% en todos los casos. * $p < 0.01$ al comparar células no viables versus células viables ($n = 5$). (C) Western blots para la detección de citocromo C y AIF en la fracción citosólica (todos realizados inmediatamente después del protocolo de 4 h, Fig. 1C). El análisis densitométrico (u.a., unidades arbitrarias) representa los valores medios \pm SD de 4 experimentos diferentes por línea celular [* $p < 0.01$ al comparar células tratadas con EMFs y HT (4h como en la Fig. 1C) versus controles sin tratar].

Figura 4

Efecto de EMFs y HT en HSP70 y HSP110 y permeabilidad lisosomal. (A) Se midieron los niveles de proteína (western blots) de Hsp70 y Hsp110 en células cancerosas después de la exposición a EMFs y HT (protocolo de 4 horas como en la Fig. 1C) y 24 horas después de la exposición (* $p < 0.01$, comparando células tratadas con EMFs y HT versus controles no tratados). El análisis densitométrico (a.u., unidades arbitrarias) representa los valores medios \pm SD para 4-5 experimentos diferentes por línea celular y punto de tiempo. (B) Se midieron las actividades de catepsina de cisteína y aspartato en la fracción citosólica después de la exposición a EMFs y HT (protocolo de 4 horas como en la Fig. 1C) ($n = 4-5$, * $p < 0.01$, comparando células tratadas con EMFs y HT versus controles no tratados). (C) Se realizó una tinción lisosomal (LysoTracker) en las células cancerosas (imágenes representativas), después del protocolo de 4 horas (como en la Fig. 1C), que muestra la difusión inducida por EMFs y HT del marcador lisosomal al citosol.

Figura 5

Efecto de EMFs, HT y quimioterapia sobre la viabilidad de células cancerosas. Las células cancerosas fueron sembradas 24 horas antes de comenzar los tratamientos. Las células fueron tratadas con EMFs y HT (4 h) como en la Figura 1C. El paclitaxel (PAC, 1 μ M) estuvo presente en el medio de cultivo durante el protocolo de 4 h (Figura 1C). La gemcitabina (GEM, 25 μ M) estuvo presente en el medio de cultivo durante los últimos 30 minutos del protocolo de 4 h. Al final del período de tratamiento de 4 h, el medio de cultivo fue cambiado y las células fueron mantenidas en cultivo durante 24 horas adicionales. * $p < 0.01$ comparando todas las condiciones versus los controles; + $p < 0.01$ comparando EMFs+HT+PAC o EMFs+HT+GEM versus PAC o GEM (n = 5).

Figura 6

Efecto de EMFs, HT y un permeabilizador natural de la membrana lisosomal o una terapia anti-Hsp70 dirigida en la viabilidad de células cancerosas. Las células fueron tratadas con EMFs y HT como en la Fig. 1C. Pterostilbeno (PT, 20 μ M) o apoptozol (Az, 4-5 μ M, dependiendo de los valores de IC50 descritos en la sección de Resultados) se agregaron al medio de cultivo justo antes (PT) o 12 horas antes de comenzar el protocolo de 4 horas (Az) (como en la Fig. 1C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparando todas las condiciones versus controles; ++ $p < 0.01$ comparando EMFs+HT+PT o EMFs+HT+Az versus PT o AZ (n = 5).

Figura 7

Efecto de EMFs + hipertermia inducida por HIFU y gemcitabina en el crecimiento del carcinoma de páncreas AsPC1. Se inocularon células cancerosas subcutáneamente el día 0 y se trató a los ratones con EMFs y HIFU según se describe en Materiales y Métodos. EMFs y HIFU se aplicaron una vez al día durante tres días consecutivos (de lunes a miércoles) durante dos semanas consecutivas a partir del día 14 después de la inoculación del tumor.

Se administró gemcitabina (50 mg/kg) dos veces, en los días 14 y 21. *p <0.05, **p <0.01 comparando todas las condiciones versus controles; ++p <0.01 comparando EMFs+HIFU-Gemcitabina versus EMFs+HIFU (n = 12 ratones por grupo experimental).

HazMIT Trabajo

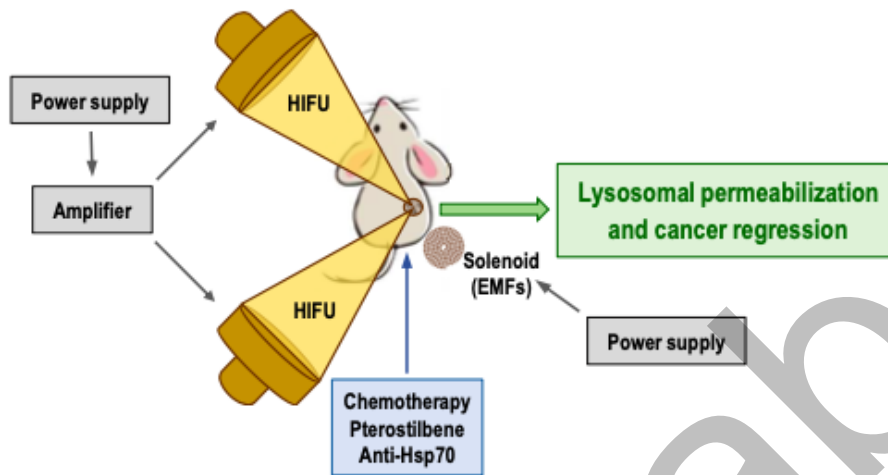
Conflicto de Intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses el 28 de febrero de 2023.

Autor correspondiente.

HazMIT Trabajo

8.2 Resumen gráfico



8.3 Aspectos destacados de la investigación

- El tratamiento efectivo contra los cánceres con altas tasas de mortalidad sigue siendo una necesidad insatisfecha.
- Este trabajo demuestra que la combinación de campos electromagnéticos y la hipertermia causan un daño irreversible a diferentes células cancerosas (es decir, melanoma, cáncer de páncreas y cáncer de mama).
- El mecanismo implica la permeabilización de los lisosomas, la liberación de catepsinas al citosol y la activación de la muerte celular dependiente de las mitocondrias.
- La combinación de campos electromagnéticos y hipertermia con quimioterapia estándar, moléculas que promueven aún más la permeabilización lisosomal y/o una terapia anti-Hsp70 dirigida, puede eliminar completamente las células cancerosas. Esta estrategia terapéutica está respaldada por evidencias in vitro e in vivo.

Figura 1

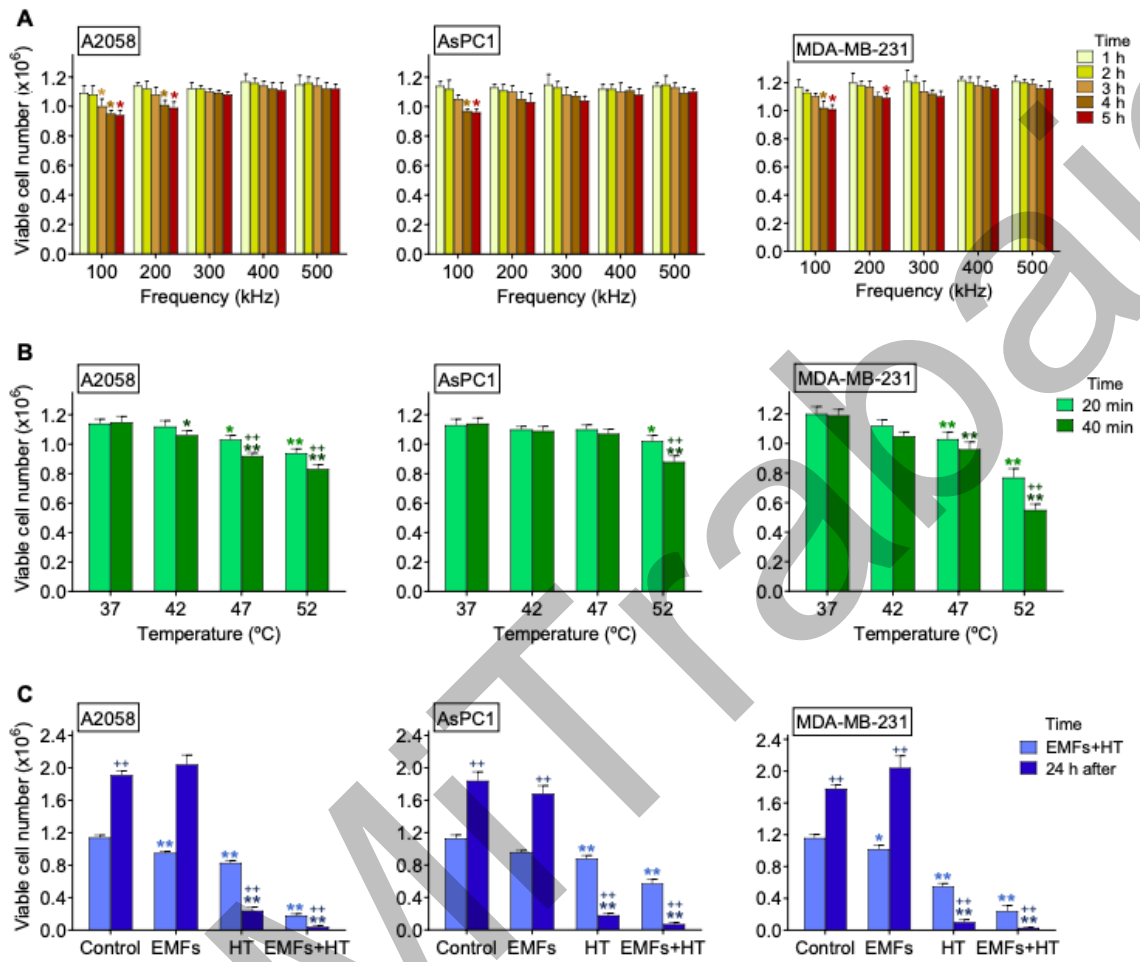


Figura 2 A

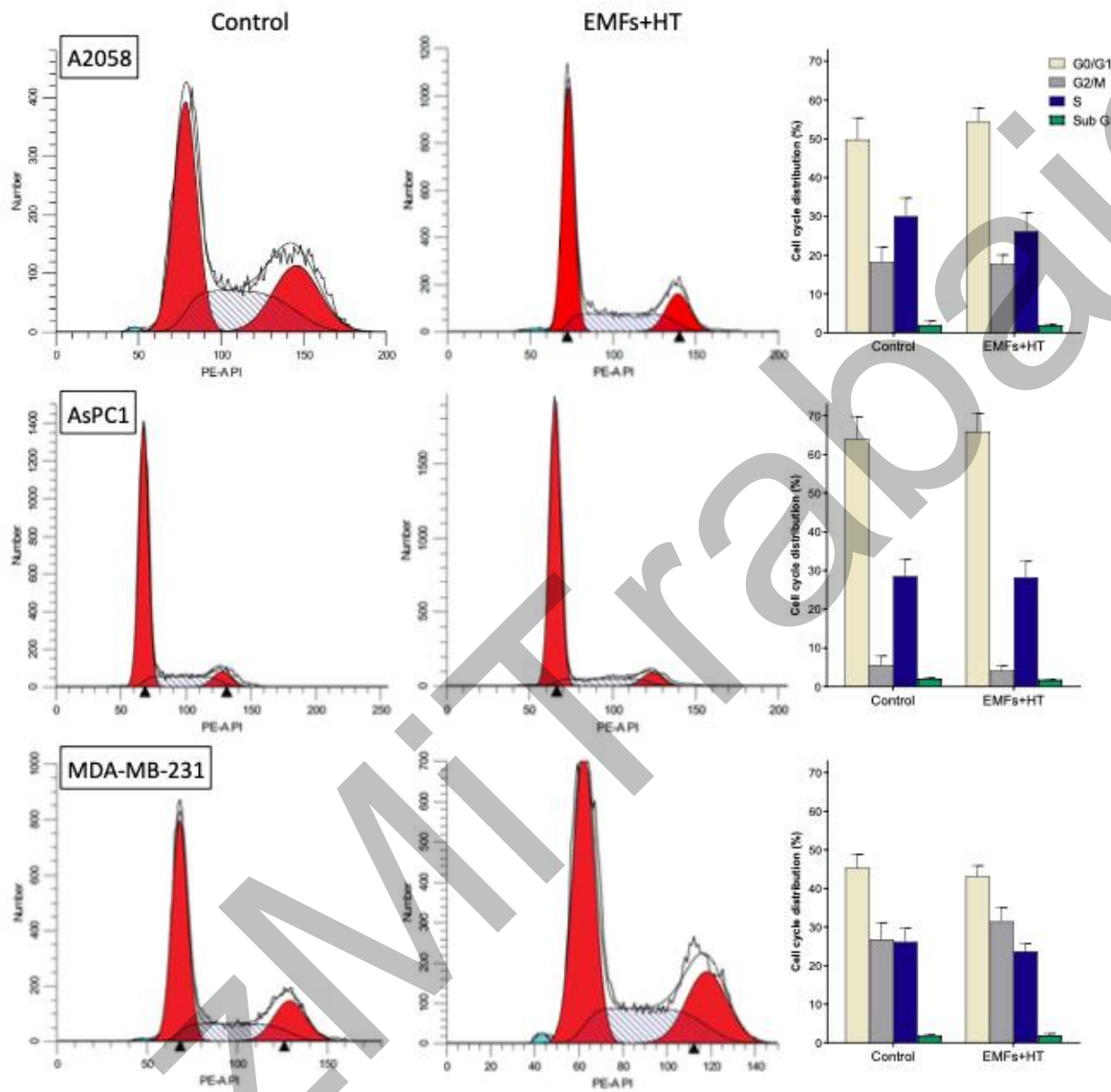


Figura 2 B

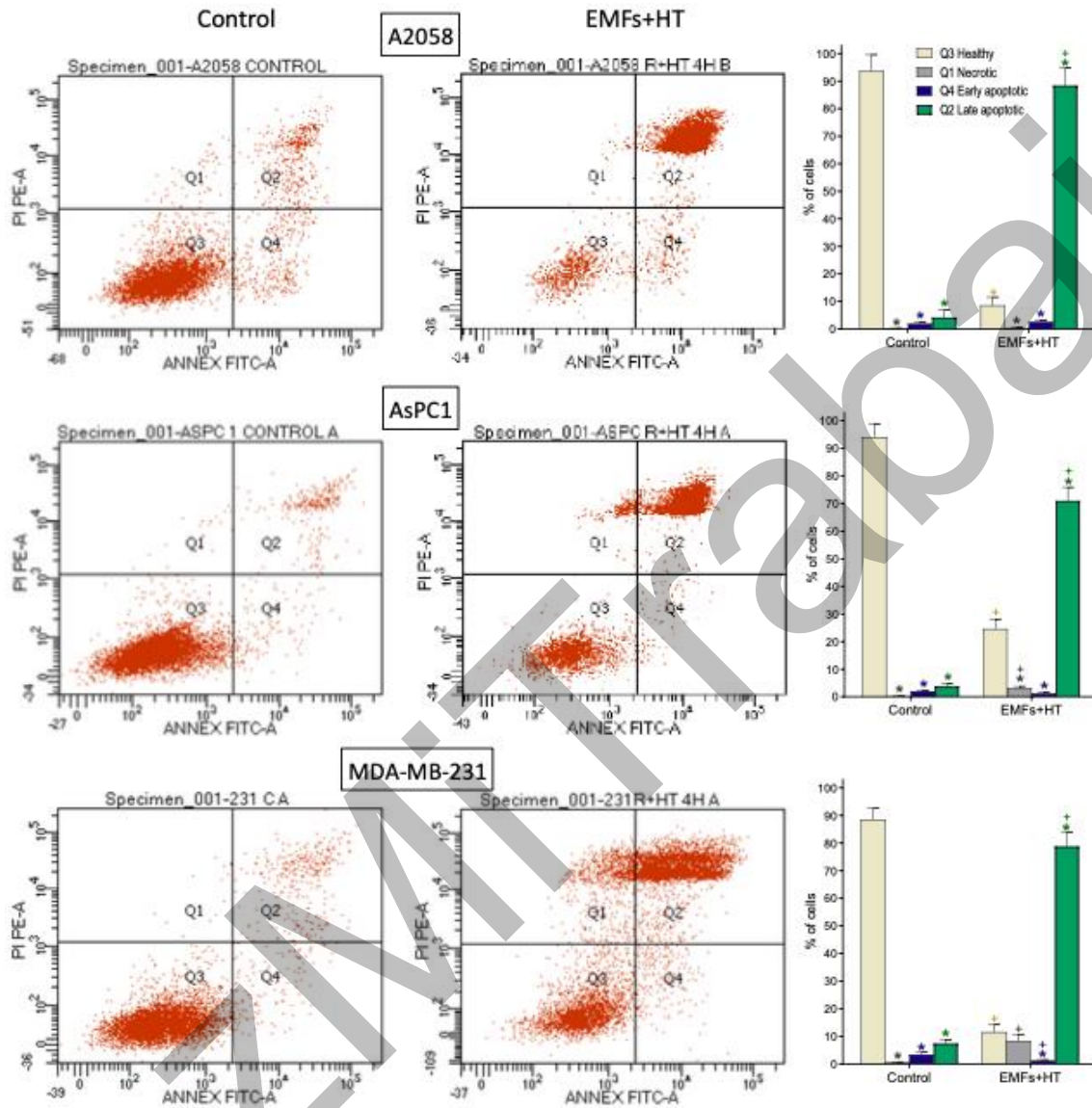


Figura 3

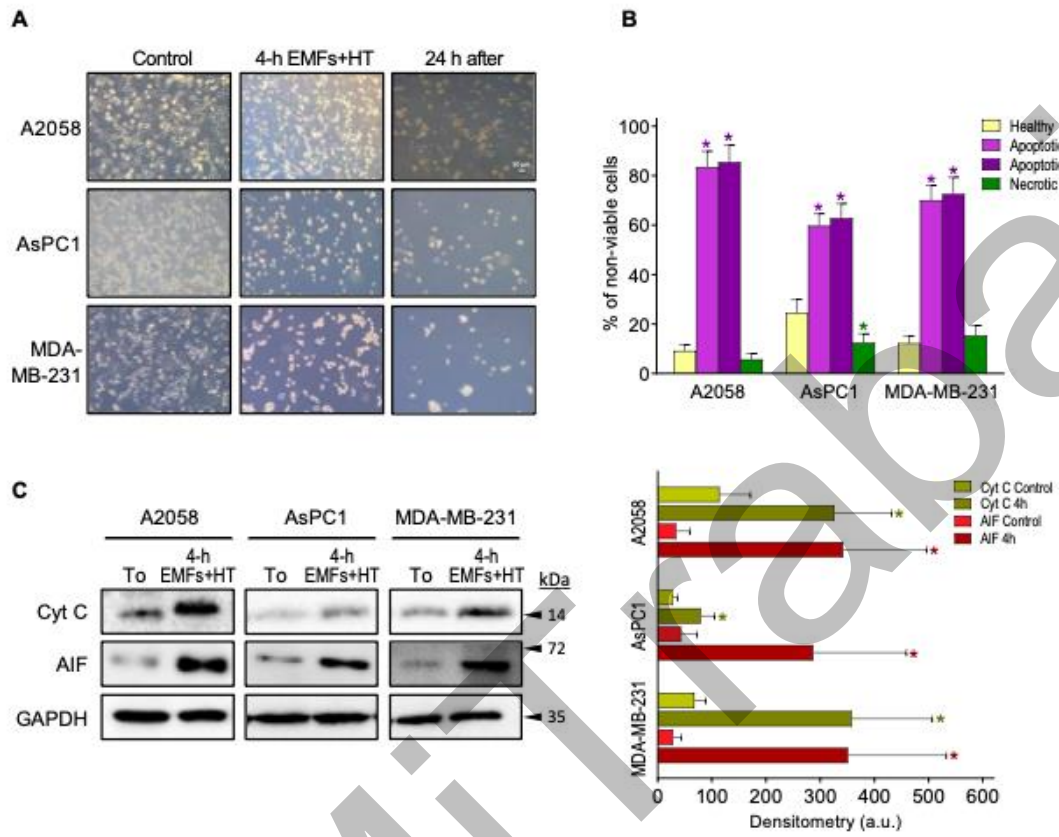


Figura 4

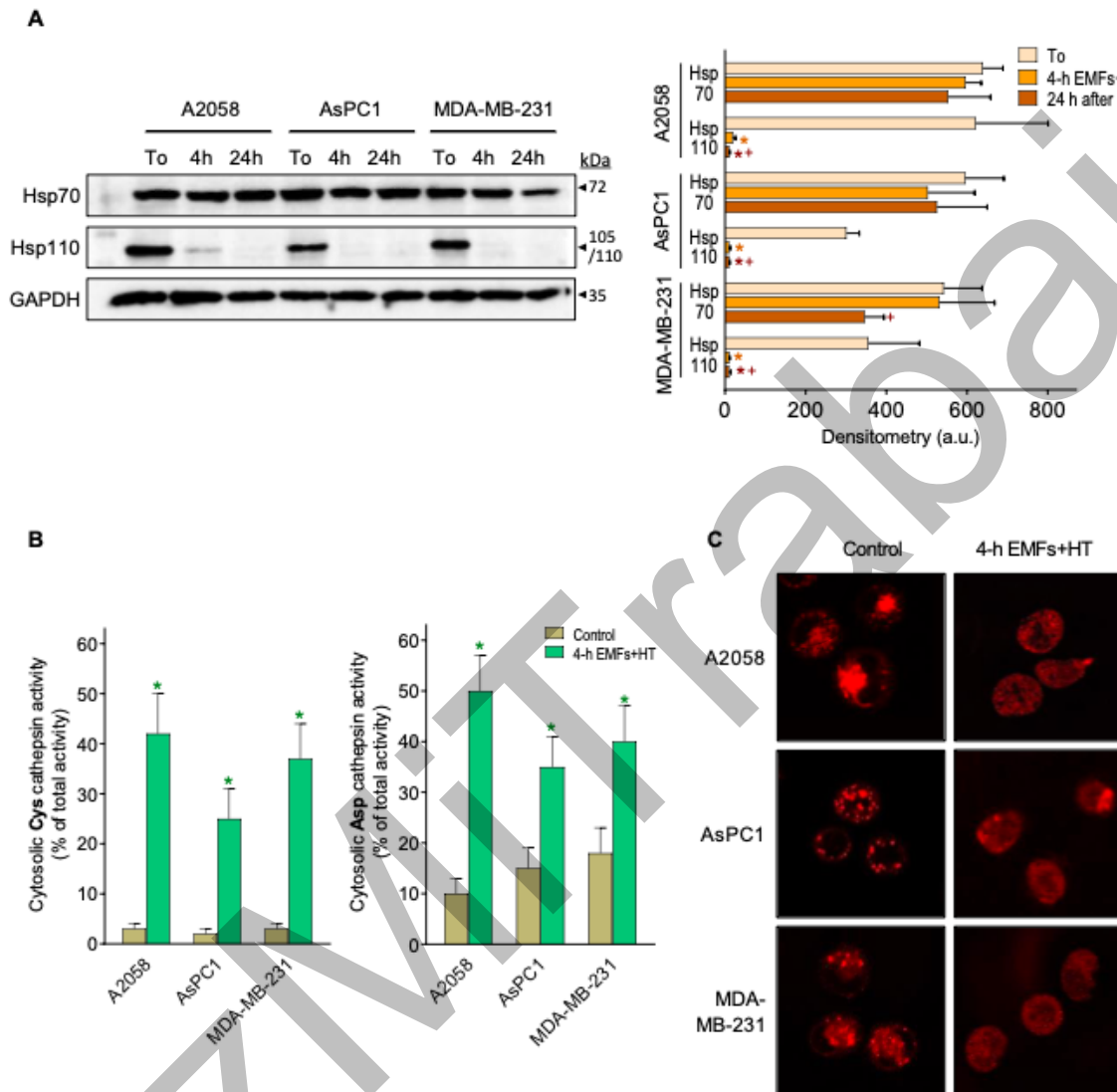


Figura 5

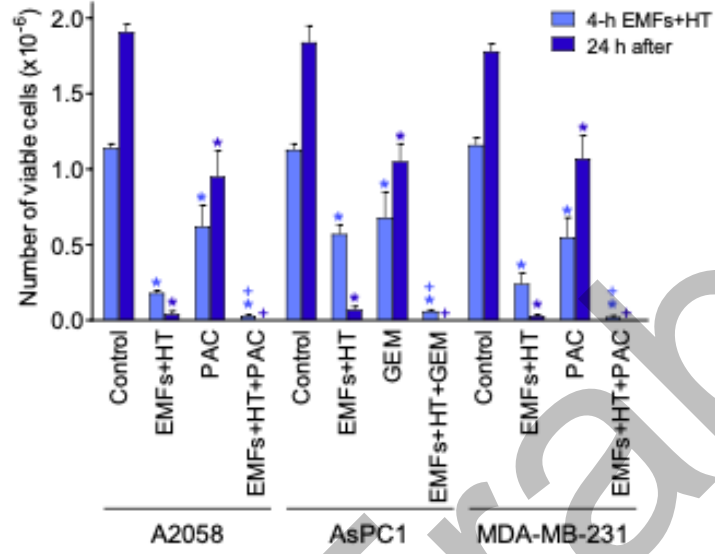


Figura 6

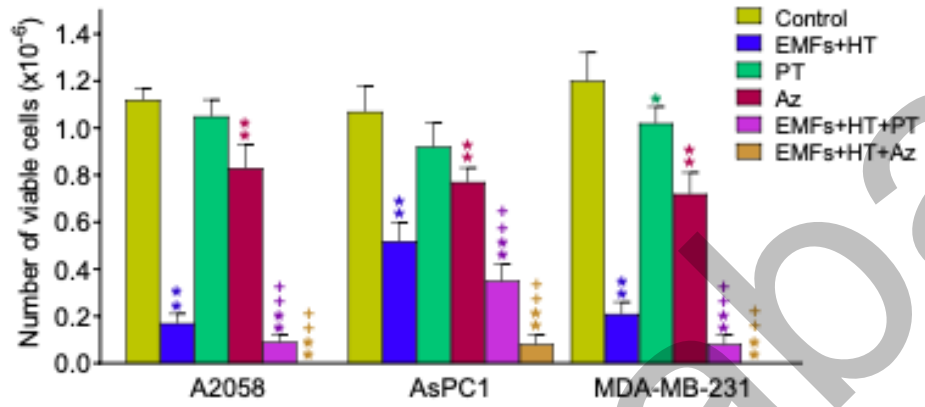


Figura 7

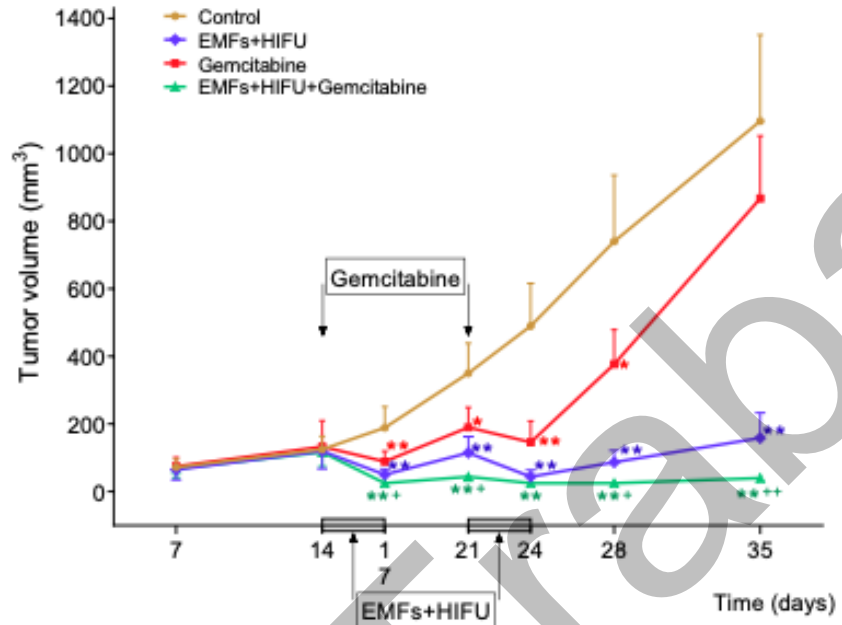


Tabla 1

| | A2058 | | AsPC1 | | MDA-MB-231 | |
|---|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | - | + EMFs+HT | - | + EMFs+HT | - | + EMFs+HT |
| O₂ consumption (pmol/10 ⁶ cells x min) | 627 ± 79 | 1067 ± 165** | 784 ± 102 | 1226 ± 188** | 551 ± 82 | 1046 ± 124** |
| H₂O₂ (nmol/10 ⁶ cells x min) | 0.77 ± 0.10 | 1.56 ± 0.31** | 0.94 ± 0.15 | 1.47 ± 0.27* | 0.62 ± 0.13 | 1.24 ± 0.29** |
| O₂^{-•} (nmol/10 ⁶ cells x min) | 0.33 ± 0.04 | 0.69 ± 0.12** | 0.45 ± 0.07 | 0.72 ± 0.15** | 0.26 ± 0.05 | 0.48 ± 0.09** |
| MMP (TPM accumulation ratio, %) | 100 ± 5 | 42 ± 15** | 100 ± 4 | 56 ± 16** | 100 ± 6 | 35 ± 12** |
| mtGSH (nmol/10 ⁶ cells) | 4.2 ± 0.9 | 2.0 ± 0.5** | 2.8 ± 0.6 | 1.3 ± 0.5** | 3.5 ± 0.7 | 1.5 ± 0.5** |
| mtATP (mM) | 1.05 ± 0.10 | 0.52 ± 0.14** | 0.96 ± 0.12 | 0.41 ± 0.09** | 0.92 ± 0.13 | 0.33 ± 0.08** |
| Caspase 3 (pmol/10 ⁶ cells x min) | 1.87 ± 0.46 | 3.66 ± 0.39** | 1.67 ± 0.35 | 3.15 ± 0.42** | 2.05 ± 0.51 | 4.14 ± 0.67** |

8.4 Materiales suplementarios

Western blots en triplicado

Fig. 3C

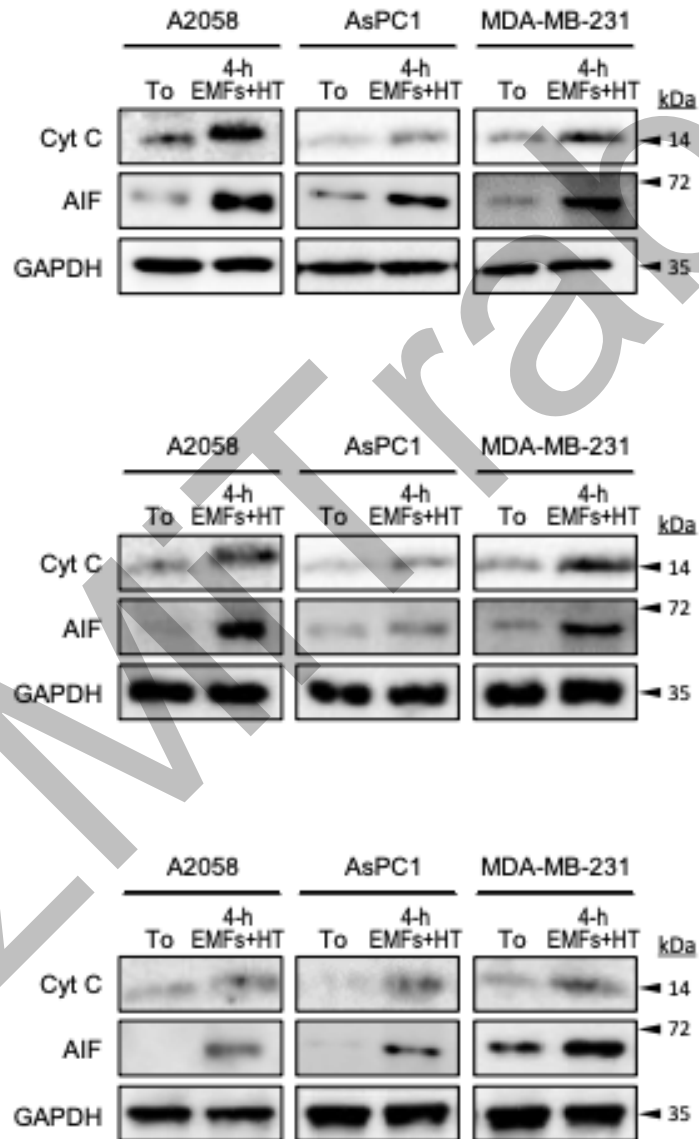


Fig. 4A

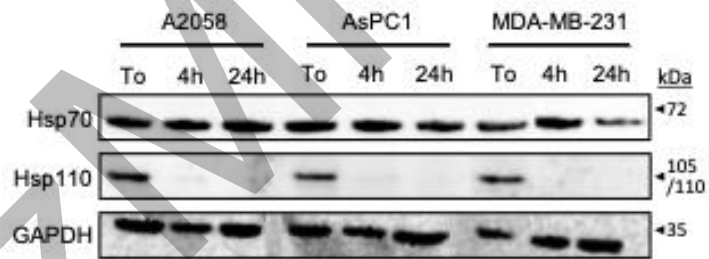
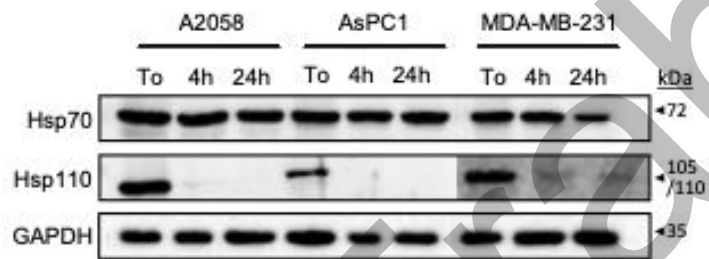
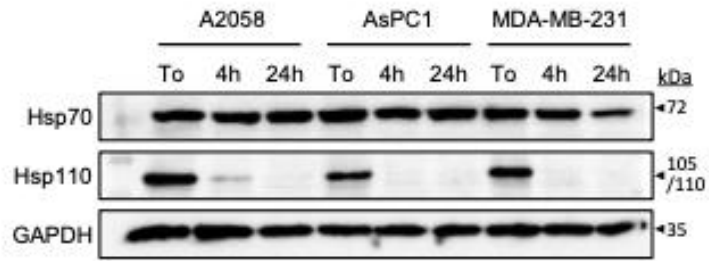


Fig. S1.A

